

Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung

# Ethylglucuronid in Haaren - Beiträge zur qualitätsgesicherten Spurenanalytik

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r   r e r u m   n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

Eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Apotheker Dominic Ammann

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

Prof. Dr. Irene Nehls

Prof. Dr. Ulrich Panne

Datum der Disputation:        07.11.2017



*Für Julia*





## Kurzzusammenfassung

Obwohl Ethylglucuronid (EtG) bereits vor 70 Jahren als Alkoholmetabolit beschrieben wurde und seit dem Jahr 2000 intensiv als Alkoholmarker in Haaren beforscht wird, bietet die Thematik weiterhin Raum für Forschung, insbesondere im Bereich der instrumentellen Analytik der Substanz. Die vorliegende Arbeit beleuchtet Aspekte der instrumentellen Analytik, der metrologischen Rückführung, der Stabilität von EtG in Referenzmaterialien und Realproben sowie Beiträge zur Entwicklung eines Schnelltestes.

Die Extraktion erfolgte überwiegend mittels einer modifizierten Version der sogenannten *Mikropulverisierung*. Sie ermöglichte die simultane Mahlung der Haarmatrix und Extraktion des EtGs mit einem hohen Probendurchsatz von bis zu 40 Proben pro Stunde bei nur 30 Minuten Extraktionsdauer. Die Selektion und anschließende Detektion erfolgte überwiegend durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie in Kopplung mit der Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS). Das verwendete Verfahren vereinte eine kurze Analysendauer von 10 Minuten mit niedriger Nachweis- und Bestimmungsgrenze von 0,46 und 2,29 pg/mg.

Die Sicherheit bei der Bestimmung des Analyten wurde durch die erfolgreiche Teilnahme an drei Ringversuchen der Society of Hair Testing (SoHT) belegt. Darüber hinaus wurden im Vorfeld zu den Ringversuchen Homogenitätsstudien zur Ermittlung der Messbarkeit der Haarmaterialien durchgeführt.

Neben Untersuchungen von 18 Fremdhaarmaterialien (Medichem Diagnostica) erfolgte die Herstellung eigener Haar-Referenzmaterialien, mit welchen viele Experimente der Arbeit unter Wiederholbedingungen durchgeführt werden konnten. Insgesamt bestand der Haar-Referenzmaterialumfang aus 13 homogenisierten Materialien von Einzelpersonen und vier Haarpoools. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Bestimmung von EtG war die Kenntnis der Stabilität des Analyten in der Haarmatrix. Jeweils ein authentisches Haar material und eines mit gezielt aufgestocktem Gehalt (Medichem Diagnostica) wurde unter thermischen Stressbedingungen eingelagert (bis zu zwei Jahre bei 40 °C und bis zu sechs Monate bei 60 °C). Der Vergleich mit Referenzproben, die bei -22 °C gelagert wurden, zeigte keinen signifikanten Abbau des Analyten in der Haarmatrix im gespikten Haar. Beim authentischen Haar konnte sogar eine Tendenz zu höheren Werten beobachtet werden.

Ein zentraler Aspekt für die metrologische Rückführung der EtG-Bestimmungen war die herstellungsbedingte Verunreinigung des deuterierten Standards EtG- $d_5$  mit nativem EtG. Mit einem Anteil von 0,28 % (m/m) lag der EtG-Anteil jedoch unter der Nachweisgrenze und hatte bei der eingesetzten Menge an internem Standard keinen signifikanten Einfluss auf die Analytik. Erst ab etwa einem Anteil von etwa 0,5 % wäre mit Störungen zu rechnen, da dann das Detektionslimit erreicht wäre.

Ein weiterer Gesichtspunkt in dieser Arbeit war die Unterstützung der Entwicklung eines Schnelltestverfahrens für die Detektion von EtG mittels monoklonalen Antikörpern (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) in Kooperation mit der Biotechnologie der Universität Potsdam und der Fa. Medichem Diagnostica GmbH. Ein Antikörper, welcher EtG in Anwesenheit von Haarmatrix bindet, konnte hergestellt werden, wenngleich die vollständige Testentwicklung während der Arbeit nicht abgeschlossen werden konnte. Neben der analytischen Begleitung des Tests wurden insbesondere auch Detektionsmethoden für potentielle Kreuzreaktanden des Antikörpers entwickelt.

Ebenso erfolgte eine Beurteilung des Zerstörungsgrads von EtG im Haar durch oxidierende Substanzen, einhergehend mit der Entwicklung eines zerstörungsfreien Schnelltests mittels Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) zur Detektion von oxidierten Cysteinspezies in Haaren. Die sechs untersuchten Materialien aus eigener Herstellung wiesen einen EtG-Gehalt zwischen 4,2 und 621,6 pg/mg auf. Dabei konnte innerhalb von 45 Minuten ein Verlust zwischen 42 und 99 % des extrahierbaren EtGs beobachtet werden. Der zerstörungsfreie Nachweis der oxidativen Behandlung von Haarmaterialien war bereits ohne sichtbare Bleichwirkung erfolgreich anwendbar.

Das Modellsystem Barthaar wurde für zwei Experimentreihen etabliert. Der EtG-Gehalt im Barthaar nach Aufnahme definierter Alkoholmengen unterlag persönlicher Einlagerungspräferenzen: Alle drei Probanden lagerten bei vergleichbaren Mengen Alkohol unterschiedlich viel EtG ins Barthaar ein. Selbst bei der Betrachtung eines einzelnen Probanden, kann kein linearer Zusammenhang zwischen aufgenommener Alkoholmenge und eingelagerter EtG-Menge hergestellt werden. Offensichtlich spielen mehrere Faktoren als nur der konsumierte Alkohol eine Rolle bei der Menge an eingelagertem EtG.

Nach Konsum bestimmter Ausgangssubstanzen lassen sich auch deren Glucuronide im Modellsystem Barthaar nachweisen. So konnte das Glucuronid von Paracetamol und das von Propofol nach Aufnahme der entsprechenden nicht konjugierten Substanzen im Barthaar zweifelsfrei nachgewiesen werden. Andere Arzneistoffglucuronide wie z.B. das der Acetylsalicylsäure, körpereigene Glucuronide wie das von Serotonin oder körperfremde Glucuronide wie das von Quercetin konnten nicht im Haar nachgewiesen werden.

## Abstract

Although ethyl glucuronide (EtG) is known as a metabolite of ethanol and is subject to intensive research as a marker substance for ethanol intake in hair since 2000, the topic still holds headroom for further studies. Especially when it comes to the instrumental analysis of the substance in hair. This thesis clarifies aspects of the instrumental analysis, the metrological traceability, the stability of EtG in reference materials and native samples as well as it contributes to the establishment of a rapid test system for the detection of EtG.

The extraction was mainly carried out using a modified version of the so called micropulverisation. It enabled the simultaneous milling of the hair matrix and the extraction of EtG with a high throughput of up to 40 samples per hour with an overall extraction time of only 30 minutes. The selection and subsequent detection was carried out mainly through high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The modified version of an existing method combined fast sample throughput with only 10 minutes HPLC analysis per sample with low limits of detection and quantification of 0,46 and 2,29 pg/mg respectively. The reliability of the measured values was constrained with the successful participation at three proficiency tests for EtG in hair by the Society of Hair Testing (SoHT). Furthermore, homogeneity studies of hair materials used in the proficiency tests have been conducted to determine the measurability of the materials.

Besides the analysis of 18 external hair materials (Medichem Diagnostica) the manufacturing of internal hair reference materials has been conducted. Many of them were used in the present studies. Finally, there was a repertoire of 13 homogenized reference materials from individual volunteers and four hair pools.

Another important aspect regarding the analysis of EtG was the knowledge about the stability of the analyte in dry hair matrix. An authentic and a spiked hair material (Medichem Diagnostica) were treated under thermal stress conditions for prolonged periods of time (up to two years at 40 °C and up to six months at 60 °C). The comparison with a reference value obtained after storing at - 22 °C revealed no significant decomposition of EtG in the hair matrix. The measurements of the authentic samples actually showed a slight trend towards higher values.

A vital topic of this thesis was the metrological traceability of the EtG measurements regarding the detectable amount of native EtG in the used internal standard EtG-*d*<sub>5</sub>. With a portion of 0,28 % (m/m) the amounts were well below the limit of detection and therefore had no significant impact in the outcome of the analysis. Only at levels of 0,5 % and above there could have been minor influence on the analytical outcome.

Moreover, there have been analytical contributions to the establishment of a rapid test system for the detection of EtG by monoclonal antibodies (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) in cooperation with the biotechnological department of the University of Potsdam and Medichem

Diagnostica GmbH. A monoclonal antibody which recognized EtG in presence of the hair matrix was established, although the final assay could not be completed in the course of this dissertation. Besides the analytical supervision of the test, methods for the detection of possible cross reagents in hair were developed in particular.

The deterioration of EtG in hair in the presence of oxidizing substances has been evaluated and the development of a non-destructive assay using Fourier-transform-infrared-spectroscopy (FTIR) to detect oxidized species in hair was performed. The six internal hair reference materials under investigation exhibited EtG yields from 4,2 to 621,6 pg/mg. Within 45 minutes, losses of extractable EtG ranging from 42 to 99 % (m/m) were observed. This non-destructive FTIR assay was already successfully applicable even before visible bleaching effects occurred.

For two different series of experiments, the model system EtG in beard hair has been introduced: The EtG content in beard hair after the oral intake of defined amounts of ethanol was subject to individual intercalation preferences. Different amounts of EtG could be found in the beard hair of three volunteers after the consumption of comparable amounts of ethanol. Even the EtG content in the beard hair of one single volunteer followed no linear correlation between ethanol intake and detectable EtG in beard hair samples. Obviously more factors than only the amount of consumed ethanol were relevant for the incorporation of EtG in hair. Also, other glucuronides could be detected in beard hair after the intake of the parent substances. The glucuronides of paracetamol and propofol were detectable in beard hair after the consumption of the drugs. Other drug derivatives like the glucuronide of acetyl salicylic acid, glucuronides of self-produced substances like serotonin or the glucuronides of natural substances such as quercetin were not detectable in beard hair.

# Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung .....	I
Abstract .....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
Danksagung .....	VII
Eidesstattliche Erklärung .....	VIII
Abkürzungsverzeichnis .....	IX
Abbildungsverzeichnis .....	XII
Tabellenverzeichnis .....	XIV
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1    Allgemeines zum Trinkalkohol.....	1
1.2    Ethanolstoffwechsel und Bildung von EtG .....	5
1.3    Aufbau von Humanhaar und Einlagerung von EtG.....	7
1.4    Grenzwerte zur Klassifizierung des Alkoholkonsums .....	11
<b>2. Problem- und Zielstellung.....</b>	<b>12</b>
<b>3. Experimenteller Teil .....</b>	<b>14</b>
3.1    Materialien .....	14
3.2    Methoden.....	17
3.2.1    Extraktion von EtG und anderer Glucuronide aus der Haarmatrix .....	17
3.2.2    Bestimmung des Anteiles von EtG im eingesetzten internen Standard EtG- <i>d</i> <sub>5</sub> .....	19
3.2.3    Herstellung von Referenzmaterialien: Einzelspendermaterialien und Haarpools.....	20
3.2.4    Lyophilisation .....	21
3.2.5    Künstliche Oxidation von Haarproben .....	22
3.2.6    Langzeitstabilität von EtG in Haaren .....	23
3.3    Chromatografische Methoden .....	24
3.3.1    Herstellung von Kalibratoren, Qualitätskontrolllösungen und internem Standard zur Bestimmung von EtG in Haarextrakten .....	24
3.3.2    Herstellung des internen Standards zur Bestimmung von EtG aus EtG- <i>d</i> <sub>5</sub> .....	25
3.3.3    Bestimmung von EtG mittels GC-MS .....	25
3.3.4    Bestimmung von EtG und weiterer Glucuronide mittels HPLC-MS/MS .....	25
<b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>29</b>
4.1    Entwicklung eines qualitätsgesicherten Verfahrens zur EtG-Analytik in Haaren.....	31
4.1.1    Extraktion mittels Mazeration .....	31
4.1.2    Extraktion mittels Mikropulverisierung .....	31
4.1.3    Extraktion mittels Ultraschall im Ultraschallbad.....	33
4.1.4    Extraktion mittels Ultraschall im Direktkontakt durch den VialTweeter® .....	34
4.1.5    Haarextraktreinigung mittels Festphasenextraktion (SPE) .....	37
4.1.6    EtG-Analytik mittels HPLC-MS/MS – ein qualitätsgesichertes Analysenverfahren.....	44

4.2	Qualitätssicherung bei der EtG-Bestimmung in Haaren: Restgehalt von EtG im internen Standard EtG- $d_5$ und Herstellung von Haar-Referenzmaterialien.....	46
4.2.1	Restgehalt von EtG im internen Standard EtG- $d_5$ .....	46
4.2.2	Herstellung und Charakterisierung von Haar-Referenzmaterialien.....	48
4.2.3	Ringversuche der SoHT zur Bestimmung von EtG in Haaren .....	52
4.2.4	Langzeitstabilität von EtG in Haaren - beschleunigte Alterung .....	61
4.3	Beiträge zur Entwicklung eines antikörperbasierten Schnelltestes für EtG in Haaren .....	66
4.3.1	Herstellung von Haarextrakten zur Evaluierung der EtG-Antikörper .....	67
4.3.2	Glucuronide als potentielle Kreuzreaktanden im ELISA: Massenspektrometrische Untersuchungen .....	69
4.3.3	Bleichen von Haaren und Einfluss auf den EtG-Gehalt und Entwicklung eines Schnelltestes für oxidativ behandeltes Haar .....	76
4.4	Einlagerung von EtG und weiteren Glucuroniden ins Haar .....	85
4.4.1	Selbstversuche am Modell Barthaar .....	85
4.4.2	Einlagerungsverhalten von EtG ins Barthaar .....	85
4.4.3	Einlagerungsverhalten der Glucuronide ausgewählter Wirkstoffe und Genussmittel .....	92
	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>97</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>108</b>
A-1	Bestimmung von EtG mittels HPLC-MS/MS durch alternative Trennsysteme.....	108
A-2	Einzelmesswerte aller Haarmaterialien von der Firma Medichem Diagnostica .....	117
A-3	Rasterelektronenmikroskopie von Haaren – intakt und gemahlen .....	121
A-4	Hielscher VialTweeter.....	125
A-5	Massenspektren der untersuchten Glucuronide .....	127
A-6	Ergänzung zu den SoHT-Ringversuchen EtG in Haaren .....	136

## **Danksagung**

Großer Dank geht an Prof. Dr. Irene Nehls und Prof. Dr. Ulrich Panne für die Vergabe des interessanten und herausfordernden Dissertationsthemas. Zusätzlich bedanke ich mich nochmals bei Prof. Dr. Irene Nehls für die Betreuung und das immer offene Ohr bei allen Fragen und Problemen. Dr. Roland Becker möchte ich herzlich danken für die fachliche Betreuung, Rat und Tat, zahllose Diskussionen, die gute Zusammenarbeit und die stets konstruktive Kritik. Weiterer Dank geht an Dipl. Ing. Christian Jung für die fachliche und praktische Unterstützung bei vielen Fragestellungen im Labor. Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn Andreas Sauer für die uneingeschränkte Hilfe beim Mahlen, Schütteln, Sieben und Homogenisieren im Technikum und die stets schnelle Unterstützung bei allen IT-Fragen. Weiterer Dank gilt Jessica Hänisch für die große Hilfe im Labor bei der Extraktion von Haarproben. Ebenso bedanke ich mich beim gesamten Fachbereich 1.2, welcher mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Besonderer Dank gilt Frau Anka Kohl für die unzähligen Messungen am ATR-FTIR und für die Bereitstellung ihrer Expertise bei dieser Analysentechnik. Bei Dr. Robert Köppen und Dr. Juliane Riedel bedanke ich mich für die Unterstützung bei analytischen Fragestellungen rund um die HPLC. Weiterer Dank geht an unsere Projektpartner bei Medichem Diagnostica GmbH, insbesondere an Herrn Insa Lô für ergebnisreiche Diskussionen und die Bereitstellung vieler Haar-Referenzmaterialien. Zu großem Dank bin ich auch der Biotechnologie an der Universität Potsdam verpflichtet, allen voran Frau Natalia Mayer und Frau Prof. Dr. Katja Hanack. Weiterhin gilt besonderer Dank meinen Bürokolleginnen Ulrike Mülown-Stollin, Caroline Goedecke und Kristin Schallschmidt für die beste Arbeitsatmosphäre und viele, viele fachliche Diskussionen. Dieser Dank gilt ebenso Dr. Stefan Merkel und Janine Richter.

Der allergrößte Dank gilt jedoch meiner Familie, insbesondere meiner Frau Julia, die mich zu jeder Zeit unterstützt hat und ohne die diese Arbeit zu diesem Zeitpunkt noch lange nicht fertig wäre.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die eingereichte Dissertationsschrift mit dem Thema

### **Ethylglucuronid in Haaren - Beiträge zur qualitätsgesicherten Spurenanalytik**

von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur gemäß § 7 Abs. 3 der zur Kenntnis genommenen Promotionsordnung vom 27.06.2012 vollständig angegeben sind. Weiterhin bestätige ich, dass ich bisher an keiner anderen Hochschule einen erfolglosen Versuch zur Promotion unternommen habe und auch den angestrebten Doktorgrad noch nicht besitze.

Neunkirchen, den 05.02.2017

Dominic Ammann



## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
a.u.	arbitrary unit (arbiträre Einheit)
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ALDH-2	Aldehyd-Dehydrogenase-2
AMP	Adenosinmonophosphat
Anti-EtG-AK	Anti-Ethylglucuronid-Antikörper
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Attenuated total reflection
AUC	Area under the curve
CAD	Collision gas
CDT	Carbohydrate-Deficient-Transferrin
CE	Collision energy
CoA-SH	Coenzym A
cps	counts per second (Zählimpulse pro Sekunde)
CUR	Curtain gas
CXP	Cell exit potential
Da	Dalton
DAD	Diode array detector
DCM	Dichlormethan
DP	Declustering potential
DST	Desialotransferrin
EP	Entrance potential
EtG	Ethyl-β-D-glucuronid
EtG- <i>d</i> <sub>5</sub>	Ethyl-β-D-glucuronid- <i>d</i> <sub>5</sub>
EtOH, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Ethanol
FAEE	Fatty acid ethyl ester
FTIR	Fourier-Transform-Infra-Red
GC	Gaschromatografie
Glc-1-P	Glucose-1-phosphat
GlcA	Glucuronsäure

GS1	Gas 1
GS2	Gas 2
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IF	Intermediärfilament
ihe	Interface heater
IS	Ionspray (Voltage)
ISTD	Interner Standard
i.v.	intravenös
k.A.	keine Angabe
LOD	Limit of detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of quantification (Bestimmungsgrenze)
LOT	Chargenbezeichnung
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
MPS	Multi-purpose sampler
MRM	Multi reaction monitoring
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrometer
ms	Millisekunde
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n.a.	nicht auswertbar
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid
NCI	Negative chemical ionization
ng	Nanogramm
PBS	Phosphate buffered saline
PEth	Phosphatidylethanol
PFPA	Pentafluoropropionic anhydride
PTFE	Polytetrafluorethylen

pg	Pikogramm
PGC	Porous graphitic carbon (poröser graphitähnlicher Kohlenstoff)
PhG	Phenyl- $\beta$ -D-glucuronid
PP <sub>i</sub>	Anorganisches Pyrophosphat
Q1	Quadrupol 1
Q3	Quadrupol 3
QC	Qualitätskontrolle
RC	Regenerated cellulose
REM	Rasterelektronenmikroskop(ie)
RP	Reversed phase
rpm	Revolutions per minute
RSD	Relative Standardabweichung (relative standard deviation)
RT	Raumtemperatur
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
SB	Stratum basale
SC	Stratum corneum
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SG	Stratum granulosum
SIM	Single ion monitoring
SPE	Solid phase extraction
SS	Stratum spinosum
TEM	Temperatur
ü.N.	über Nacht
U/L	(Enzym-) Units pro Liter
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
W	Watt
$\beta$ -D-G	$\beta$ -D-Glucuronid
$\gamma$ -GT	$\gamma$ -Glutamyltransferase

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Metabolismus von Ethanol zu Essigsäure durch enzymatische Oxidation .....	5
Abbildung 2: Bildung von $\beta$ -D-Ethylglucuronid .....	6
Abbildung 3: Feinstruktur eines menschlichen Haares.....	7
Abbildung 4: Querschnitt durch die Haut: Lokalisierung des Haares nach Wong et al. [55] .....	7
Abbildung 5: Substanzgleichgewicht im Haar .....	9
Abbildung 6: Einlagerungswege von Substanzen in die Haarmatrix.....	10
Abbildung 7: EtG-Proben zur Extraktion in einem PTFE-Halter .....	17
Abbildung 8: Aufbau des VialTweeters mit Ultraschallgenerator .....	18
Abbildung 9: Strukturformeln von Ethylglucuronid, Ethylglucuronid- $d_5$ und Phenylglucuronid.....	19
Abbildung 10: Verbleibendes Volumen im Autosampler-Vial: gewölbter Boden .....	32
Abbildung 11: Position und Dauer der im Ultraschallbad extrahierten Proben (1 - 8 Stunden).....	33
Abbildung 12: Ergebnisse nach Extraktion des Haarpoools HP-1 im Ultraschallbad in Abhängigkeit der Extraktionszeit (HPLC-MS/MS); Mittelwerte, Standardabweichungen, Probenanzahl .....	33
Abbildung 13: Zusammenfassung der Ergebnisse Ultraschallextraktionen von Haarpool HP-5-w.....	36
Abbildung 14: Repräsentatives Chromatogramm mit Störsignalen, Probe: ESM-2 .....	38
Abbildung 15: EtG- $d_5$ -Verteilung bei der SPE mit Phenomenex Strata X-AW.....	40
Abbildung 16: EtG- $d_5$ -Verteilung bei der SPE mit Phenomenex Strata X-A, Protokoll Nr.1 .....	41
Abbildung 17: EtG- $d_5$ -Verteilung bei der SPE mit Phenomenex Strata X-A, Protokoll Nr.2 .....	41
Abbildung 18: EtG- $d_5$ -Verteilung bei der SPE mit UCT Clean Screen® .....	42
Abbildung 19: Strukturen von $\beta$ -D-Ethylglucuronid, $\beta$ -D-Ethylglucuronid- $d_5$ und $\beta$ -D-Phenylglucuronid .....	46
Abbildung 20: Kalibriergerade EtG-Standards zwischen 5,6 und 106,6 pg/mg .....	47
Abbildung 21: Ergebnisse Ringversuch EtG SoHT 2012, Probe C.....	55
Abbildung 22: Externe Kalibrierung mit den Extrakten EXT-1 bis EXT-3 .....	56
Abbildung 23: Ringversuchsproben der Society of Hair Testing im RV 2013.....	57
Abbildung 24: Ergebnisse Ringversuch EtG SoHT 2013, Probe EtG-A .....	58
Abbildung 25: Ergebnisse Ringversuch EtG SoHT 2013, Probe EtG-I.....	58
Abbildung 26: Ergebnisse Ringversuch EtG SoHT 2014, Probe EtG-A .....	60
Abbildung 27: Darstellung der EtG-Gehalte von Haarmaterial 1 mit inkorporiertem EtG-Gehalt.....	63
Abbildung 28: Darstellung der EtG-Gehalte von Haarmaterial 2 mit authentischem EtG-Gehalt .....	64
Abbildung 29: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISAs, eigene Arbeit.....	67
Abbildung 30: Strukturen der untersuchten Glucuronide.....	70
Abbildung 31: Fragmentierung von EtG, ESI-, 500 ng/mL, Abbildung aus [157].....	70
Abbildung 32: Fragmentierungs-muster von EtG.....	71
Abbildung 33: Retentionszeiten der positiv ionisierten Glucuronide.....	73
Abbildung 34: Retentionszeiten der negativ ionisierten Glucuronide .....	74
Abbildung 35: Oxidation von Cystin zu Cysteinsäure: zwei Reaktionswege .....	77
Abbildung 36: Absorptionsspektrum des Haarmaterials HP-3 .....	78
Abbildung 37: Absorptionsspektrum des Haarmaterials HP-3 mit erster und zweiter Ableitung .....	78
Abbildung 38: Auswertung von Signalthöhen durch Erstellung einer Referenzlinie .....	79
Abbildung 39: Box-Plot-Darstellung der Verhältnisse von $v(S-O)$ zu verschiedenen Amid-Banden.....	80
Abbildung 40: EtG-Gehalte des Materials HP-3 nach Behandlung mit den Bleichmitteln A, B oder C.....	81
Abbildung 41: Prozentuale EtG-Gehalte nach Bleichen mit Bleichlösung B und C nach 45 Minuten .....	83
Abbildung 42: Optisches Erscheinungsbild dreier Haarproben vor und nach Behandlung mit Bleichmitteln A-C. ....	84
Abbildung 43: Konsumierte Alkoholmengen und erreichte EtG-Konzentrationen im Barthaar von Proband 1....	87
Abbildung 44: Konsumierte Alkoholmengen und erreichte EtG-Konzentrationen im Barthaar von Proband 2....	89
Abbildung 45: Konsumierte Alkoholmengen und erreichte EtG-Konzentrationen im Barthaar von Proband 3....	91
Abbildung 46: Chromatogramm des Haarextraktes von Raucher 1.....	93
Abbildung 47: Chromatogramm des Haarextraktes von Raucher 2.....	93
Abbildung 48: Chromatogramm eines Barthaarextraktes nach Aspirin-Einnahme .....	94

Abbildung 49: Chromatogramm eines Barthaarextraktes nach Paracetamol-Einnahme.....	95
Abbildung 50: Chromatogramm eines Barthaarextraktes nach Propofol-Applikation .....	96
Abbildung 51: Gegenüberstellung des Aufbaus von vollporösen und Coreshell®- Partikeln .....	108
Abbildung 52: Strukturausschnitt der HILIC-Phasenoberfläche .....	109
Abbildung 53: Chromatogramm von 1 µL einer 500 ng/mL EtG-Lösung in 90 % ACN auf Phenomenex Kinetex® HILIC; Detektion im MRM-Modus.....	109
Abbildung 54: Strukturausschnitt der Hydro-RP C <sub>18</sub> -Phasenoberfläche .....	110
Abbildung 55: Chromatogramm einer EtG/EtG-d <sub>5</sub> -Lösung auf Phenomenex Synergi® Hydro-RP.....	111
Abbildung 56: Chromatogramm von 50 µL eines HP-3-Extraktes auf Phenomenex Synergi® Hydro-RP .....	111
Abbildung 57: Chromatogramm von 50 µL eines HP-3-Extraktes auf Thermo Fisher Hypercarb® .....	112
Abbildung 58: 9-Punkt-Kalibrierung zur Detektion von EtG auf Phenomenex Synergi® Hydro-RP .....	112
Abbildung 59: Strukturausschnitt der XTerra Phenyl-Phasenoberfläche .....	114
Abbildung 60: Chromatogramm einer EtG/EtG-d <sub>5</sub> -Lösung auf Waters XTerra Phenyl .....	115
Abbildung 61: Chromatogramm einer EtG/EtG-d <sub>5</sub> -Lösung auf Waters XTerra Phenyl .....	115
Abbildung 62: Chromatogramm von 50 µL eines HP-5-w-Extraktes auf Waters XTerra Phenyl .....	116
Abbildung 63: Einzelergebnisse der Homogenitätsstudien dotierter Medichem-Materialien (1/3) .....	118
Abbildung 64: Einzelergebnisse der Homogenitätsstudien dotierter Medichem-Materialien (2/3) .....	119
Abbildung 65: Einzelergebnisse der Homogenitätsstudien dotierter Medichem-Materialien (3/3) .....	120
Abbildung 66: REM-Aufnahme der nicht-gemahlenen Haarprobe; 7000-fache Vergrößerung .....	122
Abbildung 67: REM-Aufnahme der Haarprobe 1 (Trockenmahlung bei Raumtemperatur); 7000-fache Vergrößerung .....	122
Abbildung 68: REM-Aufnahme der Haarprobe 2 (Trockenmahlung nach Versprödung mit flüssigem Stickstoff); 7000-fache Vergrößerung .....	123
Abbildung 69: REM-Aufnahme der Haarprobe 3 (Nassmahlung Kap. 3.2.1); 7000-fache Vergrößerung .....	123
Abbildung 70: REM-Aufnahme der Haarprobe 3 (Nassmahlung Kap. 3.2.1); 1000-fache Vergrößerung .....	124
Abbildung 71: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von 4-Acetaminophenyl-β-D-glucuronid; ESI <sup>-</sup> ...	127
Abbildung 72: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von ASS-acyl-β-D-glucuronid, ESI <sup>-</sup> .....	128
Abbildung 73: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Kaffeesäure-3-β-D-glucuronid; ESI <sup>-</sup> .....	129
Abbildung 74: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Kaffeesäure-4-β-D-glucuronid; ESI <sup>-</sup> .....	129
Abbildung 75: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Carvedilol-β-D-glucuronid .....	130
Abbildung 76: Nummerierung der C-Atome der funktionellen Einheiten des Carvedilol-β-D-Glucuronids .....	130
Abbildung 77: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Clopidogrel-acyl-β-D-glucuronid, ESI <sup>+</sup> .....	132
Abbildung 78: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Cotinin-N-β-D-glucuronid, ESI <sup>+</sup> .....	132
Abbildung 79: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Propofol-β-D-glucuronid, ESI <sup>-</sup> .....	133
Abbildung 80: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Quercetin-β-D-glucuronid, ESI <sup>-</sup> .....	134
Abbildung 81: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Serotonin-β-D-glucuronid, ESI <sup>+</sup> .....	135

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien .....	14
Tabelle 2: Verwendete analytische Standards .....	14
Tabelle 3: Eingesetzte Laborgeräte .....	15
Tabelle 4: Verwendete chromatografische Säulen.....	16
Tabelle 5: Ultraschallprogramme bei Verwendung des VialTweeters® .....	19
Tabelle 6: Herstellung der internen Standardlösung Phenylglucuronid .....	19
Tabelle 7: Herstellung der EtG/EtG-d <sub>5</sub> -Probe .....	20
Tabelle 8: Siebzeiten von trockenen und geschnittenen Haarmaterialien .....	21
Tabelle 9: Einwaagen und resultierende Stammlösungen von EtG und EtG-d <sub>5</sub> .....	24
Tabelle 10: Konzentrationsbereich der EtG-Standards und des internen Standards.....	24
Tabelle 11: Kenndaten zur Bestimmung von EtG nach Derivatisierung mit PFPA.....	25
Tabelle 12: Kenndaten zur Analyse von EtG mittels HPLC-MS/MS auf Thermo Fisher Hypercarb .....	26
Tabelle 13: Kenndaten zur Analyse verschiedener Glucuronide mittels HPLC-MS/MS .....	27
Tabelle 14: Analysenergebnisse für Haarpool-5 nach Extraktion mit Hielscher VialTweeter®.....	36
Tabelle 15: Sorbentien für die Festphasenextraktion von EtG .....	39
Tabelle 16: Messergebnisse des EtG-Standards mit 10,8 pg/mg nach SPE mit UCT Clean Screen® EtG.....	43
Tabelle 17: Messergebnisse des EtG-Standards mit 45,5 pg/mg nach SPE mit UCT Clean Screen® EtG.....	43
Tabelle 18: Optimierte Parameter der EtG-Analytik: Ionenquelle und Massenspektrometer.....	44
Tabelle 19: Analysenergebnisse der EtG-d <sub>5</sub> -Untersuchungslösung auf Restgehalt von EtG .....	47
Tabelle 20: Hergestellte Einzelhaarmaterialien und Haarpools.....	49
Tabelle 21: Haar-Referenzmaterialien der Medichem Diagnostica GmbH .....	51
Tabelle 22: Ergebnisse der EtG-Bestimmung des SoHT-Ringversuches 2012.....	54
Tabelle 23: Ergebnisse der EtG-Bestimmung der wässrigen Standards des SoHT-Ringversuches 2012 .....	55
Tabelle 24: Ergebnisse der EtG-Bestimmung: externe Kalibrierung, SoHT-Ringversuch 2012 .....	56
Tabelle 25: Ergebnisse der Proben EtG-A bis EtG-J des SoHT-Ringversuches 2013.....	57
Tabelle 26: Ergebnisse der EtG-Bestimmung des SoHT-Ringversuches 2014.....	59
Tabelle 27: Probenregime zur Untersuchung der Langzeitstabilität von EtG in Haaren .....	62
Tabelle 28: Analysenschema extrahierter Haarproben .....	62
Tabelle 29: Hergestellte Haarextrakte für die Evaluierung von EtG-Antikörpern .....	68
Tabelle 30: Übersicht über alle untersuchten glucuronidierten Substanzen.....	69
Tabelle 31: Beobachtete Massenübergänge aller untersuchten Glucuronide .....	72
Tabelle 32: Glucuronide mit optimierten Massenübergängen im Überblick.....	75
Tabelle 33: Wertmäßige Verhältnisse der ν (S-O)-Bande zu verschiedenen Amid-Banden .....	80
Tabelle 34: Einwaage der Haarproben und resultierendes Pooling bei Proband 1 .....	86
Tabelle 35: Wechselintervalle und jährliche Kosten: Thermo Fisher Hypercarb® .....	108
Tabelle 36: Kenndaten zur Analyse von EtG mittels HPLC-MS/MS auf Synergi® Hydro-RP.....	110
Tabelle 37: Ergebnisse der EtG-Bestimmung der Haarmaterialien HP-3 und ESM-5.....	113
Tabelle 38: Kenndaten zur Analyse von EtG mittels HPLC-MS/MS auf Waters XTerra®-Phenyl .....	114
Tabelle 39: EtG-Messwerte im Vergleich: Waters XTerra® Phenyl und Thermo Fisher Hypercarb® .....	116
Tabelle 40: Auflistung aller erhaltener Einzelergebnisse der Medichem-Materialien 1 bis 6 .....	117
Tabelle 41: Herstellung vorbehandelter Haarproben (HP-3) zur Anfertigung von REM-Aufnahmen.....	121
Tabelle 42: Statistische Daten zu Hielscher VialTweeter®.....	125
Tabelle 43: Detaillierte Einzelergebnisse zu den Extraktionsversuchen mittels Hielscher VialTweeter®.....	126
Tabelle 44: Fragmentierung des Carvedilol-β-D-glucuronids.....	131
Tabelle 45: Fragmentierungsmuster von Clopidogrel-acetyl-β-D-glucuronid .....	131
Tabelle 46: Fragmentierungsmuster von Quercetin-β-D-glucuronid .....	134
Tabelle 47: Fragmentierungsmuster von Serotonin-β-D-glucuronid.....	135

## 1. Einleitung

### 1.1 Allgemeines zum Trinkalkohol

Alkoholische (ethanolhaltige) Getränke wurden vermutlich schon in prähistorischer Zeit konsumiert. Die Entdeckung erfolgte wahrscheinlich durch den Verzehr vergorenen Fallobstes. Im alten Ägypten waren die vorherrschenden Getränke Wasser und Bier. So setzt sich die Hieroglyphe für *Mahlzeit* aus den Hieroglyphen für *Brot* und *Bier* zusammen. Im Gilgamesch-Epos (um 3000 v. Chr.) finden sich erste schriftliche Überlieferungen des Genusses von Alkohol. Etwa 1800 v. Chr. wurde im Codex Hammurapi, einer keilschriftlichen Rechtsordnung des antiken Mesopotamiens, die erste Bierschankordnung überliefert.

Während man in der griechisch-römischen Antike den Genuss von Wein schätzte, wurde von den Germanen bevorzugt Honigwein und Bier konsumiert [1]. Im Mittelalter nahm der Alkoholgenuss immer mehr den Charakter von Gelagen an, dabei wurde es als unhöflich erachtet, angebotene Getränke abzulehnen. Ebenso war es ein Zeichen von Schwäche und Unmännlichkeit. Das Kampftrinken war eine in den Trinksitten vorgeschriebene Art des Duells ohne Waffen. Dabei trank man bis zur Bewusstlosigkeit. Wollte man sich diesem Habitus entziehen, hatte das soziale Ausgrenzung oder in manchen Fällen sogar die Erklärung zum Feind zur Folge [2]. Diese Sitten führten zu ersten Gedanken an die Eindämmung übermäßigen Konsums. So wurde jeder deutsche Kaiser vor der Krönung in Rom gefragt: „Willst Du mit Gottes Hilfe dich nüchtern halten?“ [3].

In der Neuzeit ging die weltliche und geistige Obrigkeit gegen diese Trinksitten vor. Kaiser Friedrich III. trank nur noch zum Abendessen Wein. Im 18. Jhd. fand der Verkauf von Branntwein in kleinen Gebinden in Apotheken als Arznei statt<sup>1</sup>.

Im Jahr 2013 konsumierten die Deutschen 9,7 L reinen Alkohol pro Einwohner. Deutschland zählt somit zu den Hochkonsumländern. Der weltweite Durchschnitt lag 2013 bei 6,2 L reinem Alkohol pro Kopf. Diese Menge entspricht, umgerechnet auf das Gesamtvolumen alkoholischer Getränke, etwa 137 L. Aufgeschlüsselt nach Alkoholsorten entfallen etwa 107 L auf Bier, 21 L auf Wein, knapp 6 L auf Spirituosen und 4 L auf Schaumwein oder Sekt [4].

Neben der exogenen Aufnahme durch alkoholische Getränke oder die Nahrung, wird Ethanol selbst in sehr geringen Mengen von der mikrobiologischen Flora im menschlichen Verdauungstrakt durch Fermentation produziert [5]. Dabei entstehen täglich etwa 3 g Ethanol.

Alkohol ist aber nicht nur Genussmittel, es ist auch Suchtmittel mit vielen dosisabhängigen Kurz- und Langzeiteffekten. Neben kurzzeitigen Beeinträchtigungen der Urteils- und Reaktionsfähigkeit bei schon geringen Dosen, welche sich oft im Straßenverkehr bemerkbar machen, bestehen auch ernstzunehmende Langzeitr Risiken. Bei chronisch exzessivem Konsum<sup>2</sup> können eine Reihe Langzeitschäden, die von sozialen und beruflichen Problemen über körperliche Schäden wie z.B. Leberzirrhose oder Hirnatrophien führen, entstehen. Auch das vermehrte Auftreten verschiedener Krebserkrankungen wie Mund-, Rachen- oder Speiseröhrenkarzinomen stehen im Zusammenhang mit übermäßiger Aufnahme von Alkohol [6].

Schätzungen für das Jahr 2002 geben an, dass der Alkoholkonsum in Europa Grund für den Verlust von etwa 10 Millionen Lebensjahren ist (Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V., [www.dhs.de](http://www.dhs.de)).

Neben den gesundheitlichen Folgen erwachsen aus dem (übermäßigen) Konsum alkoholischer Getränke auch direkte oder indirekte wirtschaftliche Schäden. Diese belaufen sich in Deutschland nach Effertz [7] auf jährlich geschätzt ca. 40 Mrd. Euro.

---

<sup>1</sup> Pharmazeutische Zeitung, Ausgabe 08/2012

<sup>2</sup> Risikoarmer Alkoholkonsum: 24 g pro Tag für Männer, 12 g pro Tag für Frauen, Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen; 20 g täglich für Männer, 10 g täglich für Frauen, Deutsche Gesellschaft für Ernährung

Riskanter Alkoholkonsum: 60 - 120 g täglich bei Männern, 40 - 80 g täglich bei Frauen

Hochkonsum: mehr als 120 g täglich bei Männern und mehr als 80 g täglich bei Frauen (Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen)

Alkoholkontrollen spielen im täglichen Leben eine große Rolle, wenn es um die Beurteilung der Verkehrssicherheit geht, aber auch Sorgerechtsverhandlungen, Arbeitsplatz- und Therapieüberwachungen sind auf sichere Alkoholkontrollmechanismen angewiesen.

Um das Trinkverhalten zu klassifizieren, muss es Methoden und Nachweissysteme geben, Alkohol direkt oder indirekt im Körper nachzuweisen. Neben dem direkten Nachweis von Alkohol im Blut oder im Atem durch Bestimmung der vorliegenden Konzentration besteht auch die Möglichkeit, Metaboliten oder Stoffwechselprodukte des Ethanols nachzuweisen oder auch bestimmte Proteine im Blut zu überwachen. Einige wichtige Alkoholmarker sollen im Folgenden kurz vorgestellt und nach der Eignung als Kurz- oder Langzeitmarker klassifiziert werden.

### **Direkte Alkoholkonsummarker**

Direkte Marker werden aus der Substanz Ethanol durch metabolische Umwandlung gebildet. Sie können also in nennenswerter Menge nur nach Aufnahme von Alkohol entstehen. Ihre Anwesenheit bedingt also zwingend das Vorhandensein von Ethanol.

#### *Ethanol*

- Direkter Nachweis von Ethanol im Blut oder Atem
- Zeitfenster: wenige bis mehrere Stunden
- Aussage über den kurzfristigen Alkoholkonsum
- Keine Aussage über länger zurückliegende Trinkereignisse möglich

#### *Fatty Acid Ethyl Esters (FAEE)*

- Bildung durch enzymatische Reaktion von Ethanol mit Triglyceriden, Lipoproteinen und Phospholipiden
- Eintrag ins Haar über Sebum [8]
- Große Klasse an Substanzen durch Vielzahl an Reaktionspartnern
- Die am häufigsten nachgewiesenen Substanzen sind: Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat
- Zeitfenster Haare: Wochen bis Monate
- Zeitfenster Blut: 24 bis 44 Stunden abhängig von Dosis und Trinkverhalten [9]

#### *Phosphatidylethanol (PEth)*

- Entstehung durch enzymatische Reaktion von Ethanol mit Phosphatidylcholin in der Zellmembran, aber auch mit anderen Phospholipiden
- Große Klasse an Substanzen, da viele im Körper vorkommende Lipide
- Zeitfenster Blut: sieben Tage, bei chronischem Konsum bis 29 Tage [9]

#### *EtG (Ethylglucuronid)*

- Entstehung als Phase-II-Metabolit durch Reaktion von Ethanol mit Glucuronsäure durch das Enzym UDP-Glucuronosyl-Transferase
- Untergeordneter Entgiftungsweg für Ethanol (0,02 % - 0,06 % renale Ausscheidung [10])
- Erste Beschreibung durch Kamil et al. 1952 im Kaninchen nach Alkoholinfusion [11]
- Erstmalige Identifikation in Ratten- und Menschenurin durch Jaakonmaki et al. 1967 [12]
- Erste Beschreibung in menschlichem Serum nach Synthese durch Schmitt et al. [13]
- Erster Nachweis in Haaren: Pragst et al. 2000 [14]
- Nachweis in: **Schweiß** [8, 15-17]  
**Blut:** bis zu 18 Stunden nach Konsum [16, 18, 19],  
**Meconium:** Wochen bis Monate [20-25]  
**Haare:** drei bis sechs Monate [17, 26-41].  
**Urin:** etwa 80 Stunden [9, 42-45]
- Einlagerung ins Haar über Schweiß und Blut [46]



- Geringe Einlagerung ins Haar da saure Substanz ( $pK_a = 3,21$ ), daher sensitive Analysenmethoden nötig, um kleinste Mengen EtG detektieren zu können [9]
- Etablierung von Grenzwerten im Haar, 3 - 6 cm lange Strähnen werden benötigt [47, 48]

### Indirekte Alkoholkonsummarker

Indirekte Marker entstehen nicht aus Ethanol. Bei Ihnen handelt es sich vielmehr um die Begleiterscheinung der Anwesenheit von Ethanol. Fast immer sind es Leberenzyme, welche nach Leberzellschädigung vermehrt ins Blut übertreten und dort nachgewiesen werden können. Die folgenden Enzyme und Parameter stehen als indirekte Alkoholmarker im Zusammenhang mit einem möglichen Alkoholabusus [49].

#### $\gamma$ -GT ( $\gamma$ -Glutamyltransferase)

- Ein Enzym, welches den Glutamylrest von Glutathion auf Peptide oder Wasser überträgt
- Normalwerte: 42 U/L<sup>3</sup> bei Frauen und 60 U/L bei Männern
- Eine Erhöhung des Wertes wird mit verschiedenen Lebererkrankungen in Zusammenhang gebracht
- Erhöht bei Alkoholkonsum und -missbrauch (Dauer: über zwei bis drei Monate)

#### ASAT (Aspartat-Aminotransferase)

- Leberenzyme, Katalysieren die Umwandlung von  $\alpha$ -Ketoglutarat in Glutamat
- Normalwert: < 52 U/L
- Ähnlich wie  $\gamma$ -GT erhöht durch Krankheiten, Medikamente oder Alkohol

#### ALAT (Alanin-Aminotransferase)

- Leberenzym, welches hauptsächlich im Zytoplasma vorkommt
- Normalwert: um 50 U/L
- Katalysiert die Reaktion von L-Alanin und  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Pyruvat und L-Glutamat
- Erhöht nach Lebererkrankungen mit Zellschädigung, Arzneimitteln, Vergiftungen, Alkoholkonsum

#### CDT (Carbohydrate-Deficient-Transferrin) = DST (Desialotransferrin)

- Variante des Glycoproteins Transferrin im menschlichen Serum
- Normwerte: Mann: 20 U/L, Frau 26 U/L, erhöht ab 30 U/L bis > 60 U/L
- Das Protein erfährt eine Strukturveränderung bei Alkoholzufuhr und die Serumkonzentration steigt an
- Werte nach chronischem Konsum zwei bis vier Wochen erhöht

#### MCV (Mittleres Erythrozyteneinzelvolumen)

- Gibt die mittlere Zellgröße der Erythrozyten an

$$MCV (fl) = \frac{\text{Hämatokrit (Vol-\%)} \times 10}{\text{Erythrozytenzahl pro mm}^3}$$

$$(1 fl = 1 \mu m^3)$$

- Normwert: zwischen 80 und 98 fl, ab 98 fl: Alkoholabusus

---

<sup>3</sup> U = Enzymeinheit, entspricht der Menge Enzym, welche unterdefinierten Bedingungen (zumeist 30°C) in einer Minute ein  $\mu$ mol Substrat umzusetzen vermag. Die Einheit U/L entspricht somit der Enzymkonzentration.

Indirekte Marker sind generell anfällig für Störungen. Dies liegt darin begründet, dass die Leberenzyme nicht nur bei Alkoholabusus ansteigen, sondern auch durch Infektionen, Vergiftungen, Arzneimittel oder andere Lebererkrankungen wie z.B. Hepatitis oder Karzinome beeinflusst werden.

Es ist deshalb wichtig, eine funktionierende Analytik anzuwenden, welche auf einem direkten Marker fußt, um die Störanfälligkeit so weit wie möglich zu minimieren.

Soll nicht nur der kurzfristige Alkoholkonsum z.B. bei Verkehrsunfällen überwacht werden, sondern auch der längerfristige, so ist man auf einen verlässlichen direkten Marker in einer stabilen, zugänglichen Matrix angewiesen. Dazu eignet sich der direkte Alkoholmarker EtG in der Matrix Haar. Dessen Kontrolle hat sich bei der medizinisch-psychologischen Untersuchung zur Wiedererlangung der Fahrerlaubnis durchgesetzt, aber auch bei der Abstinenzkontrolle während Entziehungskuren, der Arbeitsplatzüberwachung oder bei Rechtstreitigkeiten mit Alkoholbezug.

## 1.2 Ethanolstoffwechsel und Bildung von EtG

Die überwiegende Menge des aufgenommenen Ethanols unterliegt dem hauptsächlich in der Leber stattfindenden Stoffwechsel. Ein Großteil wird dabei von zwei Enzymen abgebaut; der Alkoholdehydrogenase (ADH) und der Aldehyddehydrogenase-2 (ALDH-2). ADH katalysiert die Oxidation von Ethanol zum giftigen Acetaldehyd unter Verbrauch eines Äquivalentes Nikotinadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ), auf welches formal Wasserstoff übertragen wird. Im zweiten Schritt folgt die katalytische Oxidation des Acetaldehyds zu Acetat unter Verbrauch eines weiteren Äquivalentes  $\text{NAD}^+$ . Das gebildete Acetat kann nun in eine Vielzahl von Stoffwechselwegen eingehen, von welchen der Zitratzyklus den wichtigsten darstellt. Er dient dem Energiegewinn durch Bildung von Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) in der Atmungskette. Um Acetat für diesen Weg nutzbar zu machen, muss es mit Coenzym-A verbunden werden. Dies geschieht mit Hilfe des Pyruvatdehydrogenase-Enzymkomplexes, welcher Acetat auf Coenzym-A unter Freiwerden eines  $\text{CO}_2$ -Moleküls überträgt (Abbildung 1).

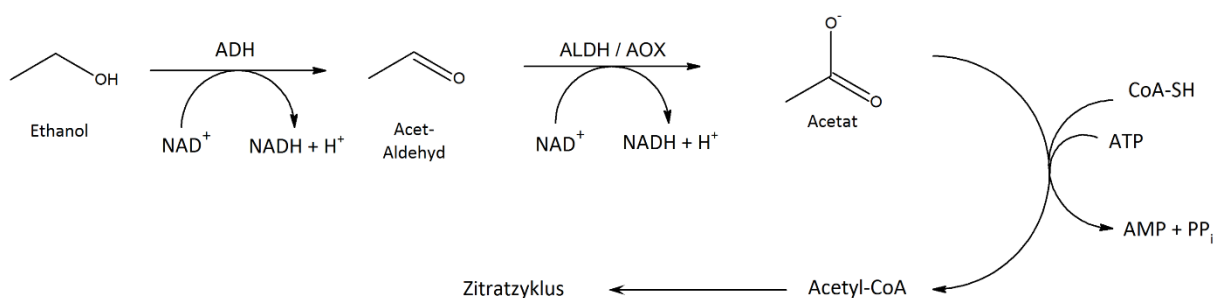


Abbildung 1: Metabolismus von Ethanol zu Essigsäure durch enzymatische Oxidation  
Zwischenstufen: Acetaldehyd; ADH, Alkohol-Dehydrogenase; ALDH, Aldehyd-Dehydrogenase; AOX, Aldehydoxidase; CoA-SH, Coenzym A; ATP, Adenosintriphosphat; AMP, Adenosinmonophosphat;  $\text{PP}_i$ , anorganisches Pyrophosphat; Acetyl-CoA, Acetyl-Coenzym A; eigene Darstellung nach Mutschler Arzneimittelwirkungen, 9. Aufl.

Der oben gezeigte Metabolisierungsweg bestimmt etwa 90 - 95 % der Ausscheidungsmenge von aufgenommenem Trinkalkohol. Ein mengenmäßig unbedeutenderer Ausscheidungsweg (3 – 8 %) ist die Oxidation zu Essigsäure durch Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen, das sogenannte mikrosomale Ethanol-oxidierende Enzym-System (MEOS) [50]. Geringe Mengen Ethanol werden auch ohne metabolische Interaktion unverändert renal oder pulmonal ausgeschieden oder ausgeschwitzt [9, 16, 17, 51].

Ein weiterer Stoffwechselweg findet seinen Ursprung im Phase-II-Metabolismus. Er dient dazu, körpereigene oder körperfremde Stoffe durch Hydrophilisierung leichter ausscheidbar zu machen. Beispiele hierfür sind die Sulfatierung und Glucuronidierung in der Leber. Auch Ethanol unterliegt diesen Mechanismen. Es bildet sich Ethylsulfat und Ethylglucuronid. Letzteres wird allerdings nur zu einem sehr geringen Umfang gebildet (0,02 % - 0,06 % der aufgenommenen Alkoholmenge) [10]. Die Erstbeschreibung und -isolierung von EtG erfolgte durch Kamil et al. [11]. Abbildung 2 zeigt den Biosyntheseweg ausgehend von Glucose-1-Phosphat, welches aus der Glycogenolyse entsteht.

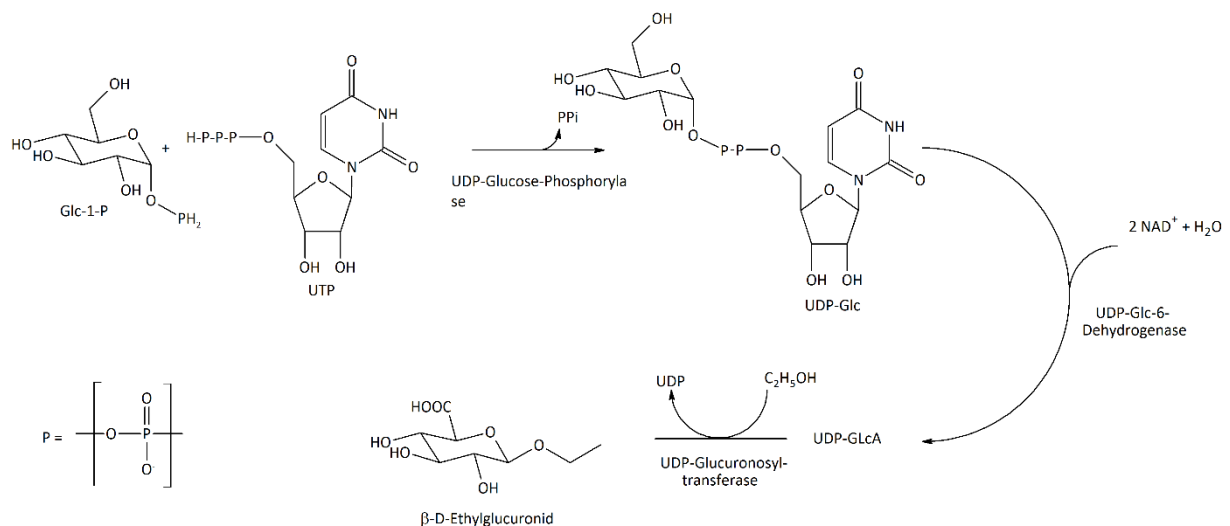


Abbildung 2: Bildung von  $\beta$ -D-Ethylglucuronid ausgehend von Glucose-1-Phosphat über mehrere Zwischenstufen; Glc-1-P, Glucose-1-Phosphat; UTP, Uridintriphosphat; UDP, Uridindiphosphat;  $\text{NAD}^+$ , Nikotinamidadenindinukleotid; GlcA, Glucuronsäure;  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , Ethanol; eigene Darstellung nach [52-54]

Umgesetzt durch die UDP-Glucose-Phosphorylase reagiert ein Mol Glucose-1-Phosphat (Glc-1-P) mit einem Mol Uridintriphosphat (UTP). Nach Abspaltung von anorganischem Pyrophosphat ( $\text{PP}_i$ ) bildet sich Uridindiphosphat-Glucose (UDP-Glc). Dieses reagiert, katalysiert durch die UDP-Glucose-6-Dehydrogenase (UDP-Glc-6-DH), unter Verbrauch von zwei Äquivalenten  $\text{NAD}^+$  und Wasser weiter zur UDP-Glucuronsäure (UDP-GlcA). Die so aktivierte Glucuronsäure kann nun auf geeignete funktionelle Gruppen wie Hydroxy-, Amino- oder Carboxylgruppen übertragen werden.

### 1.3 Aufbau von Humanhaar und Einlagerung von EtG

Der Mensch trägt fast auf seinem gesamten Körper Haare. Es gibt nur wenige Ausnahmen, wo dies nicht der Fall ist, z.B. die Hand- und Fußinnenflächen, die Brustwarzen und die Lippen (genauer: das Lippenrot). Schleimhäute können, müssen aber nicht behaart sein.

Das menschliche Haar ist in drei Schichten untergliedert: Cuticula, Cortex und Medulla. Dabei entspricht die Cuticula der äußersten Schicht. Sie wird auch Schuppenschicht genannt. Im Wesentlichen besteht sie aus verhornten, abgestorbenen Zellen. Die in sechs bis zehn Schichten angeordneten Zellen liegen bei gesundem Haar flach an. So entsteht auch der charakteristische Glanz des Haares.

Der Cortex (Rinde), auch Faserschicht genannt, bildet mit etwa 80 % den größten Anteil des Haares. Er wird aus feinsten Keratinfasern, den Fibrillen gebildet, welche auf Molekülebene zu Tetrameren angeordnet sind. Diese schließen sich zu sogenannten Intermediärfilamenten (IF) zusammen. Viele dieser Intermediärfilamente bilden die sogenannten Mikrofibrillen, wovon eine Vielzahl zu Makrofibrillen zusammengefasst werden. Vergleiche dazu auch Abbildung 3.

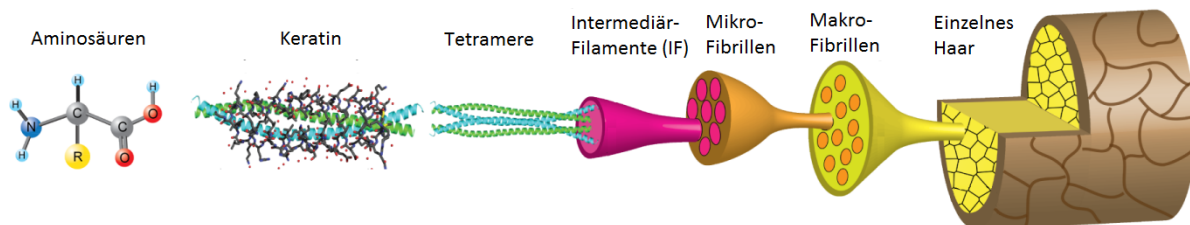


Abbildung 3: Feinstruktur eines menschlichen Haares  
bearbeitete Version nach Yang F., Zhang Y., Rheinstädter M.C. <sup>4</sup>

Das Haar in seiner Gesamtheit ist durch die Haarwurzel in der Dermis verankert. Die Versorgung des Haares mit Nährstoffen erfolgt durch Blutgefäße. Der Haarschaft ragt durch die Epidermis, die sich in das stratum basale (SB), das stratum spinosum (SS), das stratum granulosum (SG) und das stratum corneum (SC), die äußerste, verhornte Schicht unserer Haut, gliedert, hindurch [56]. Eine Talgdrüse mit Verbindung ins Innere des Schaftes befindet sich in der Nähe der Durchtrittsregion ins stratum basale. An der Wulstregion sitzt ein Haarbalgmuskel, der das Haar bei äußeren Reizen wie zum Beispiel Kälte aufstellen kann. Die Wurzelregion des Haares selbst gliedert sich in die Haarpapille, den Ursprung des Haares und die Matrix, aus der das Haar gebildet wird. Dort werden auch die Melanozyten eingelagert, welche maßgeblich für die Färbung des Haares verantwortlich sind. Die Hornzellen, welche viel Keratin enthalten, schieben sich, getrieben durch die Neubildung in der Wurzel, im Haarschaft immer weiter

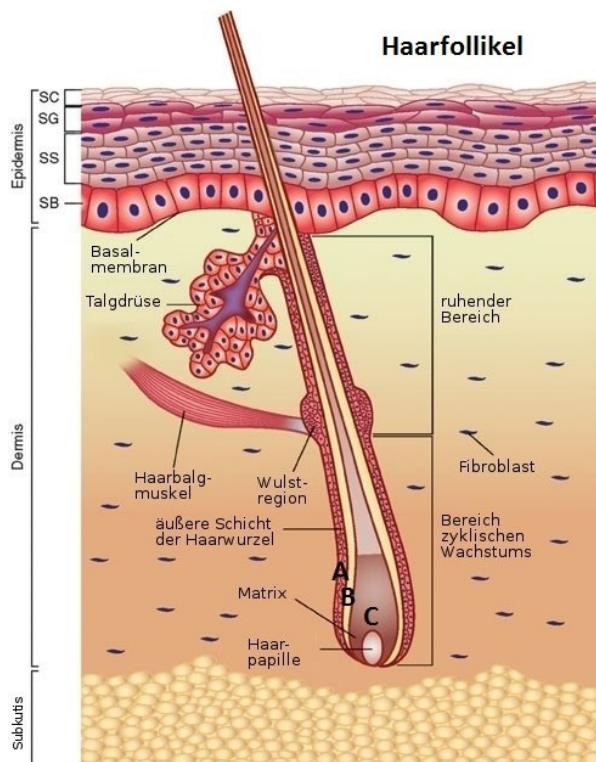


Abbildung 4: Querschnitt durch die Haut:  
Lokalisierung des Haares nach Wong et al. [55] <sup>5</sup>

<sup>4</sup> Bild unter freier Lizenz 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

<sup>5</sup> Bild unter freier Lizenz 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>)

nach oben. Dabei verliert das Haar sukzessive immer mehr Wasser und nimmt die feste Form an, die es an der Hautoberfläche besitzt. Die Haarwurzel selbst ist von der Haarwurzelscheide umgeben. Sie besteht aus drei Schichten (Abbildung 4):

A: Henle-Schicht (außen)

B: Huxley-Schicht (mittig)

C: Cuticula (innen)

Die innere Schicht des Follikels selbst ist verhornt. Die Schuppen sind gegen die Wurzel orientiert. Die entstehenden Schuppen des Haares sind gegen die Spitze gerichtet. Somit verzahnen die entgegengesetzt ausgerichteten Schuppen und das Haar wird im Follikel verankert [17, 55, 57, 58].

### **Wachstum**

Das Wachstum des Haares findet in Zyklen statt. Diese gliedern sich in je drei Wachstumsphasen: die Anagenphase, die Katagenphase und die Telogenphase. Jährlich werden etwa 15 cm Kopfhaar gebildet; das entspricht somit einer täglichen Wachstumsrate von ca. drei bis fünf Millimetern.

Die Anagenphase ist die Phase des Wachstums. Etwa 85 – 90 % des Kopfhaares befinden sich in diesem Stadium. Zu Beginn werden neue Haarwurzeln gebildet und das Haar wächst. Sie dauert zwischen zwei und sechs Jahren an. Haare in dieser Wachstumsphase werden auch *Papillarhaare* genannt.

Die Katagenphase ist bedeutend kürzer. Sie dauert nur etwa zwei bis drei Wochen an. Während dieser Zeit wird die Zellproduktion eingestellt und das Haar löst sich von der Papille, welche zugrunde geht. Etwa ein Prozent der Kopfbehaarung befindet sich stetig in dieser Phase. Die Bezeichnung für Haare in diesem Entwicklungszyklus lautet *Beethaare*.

Die Endphase bezeichnet man als Telogenphase. Bis zu 18 % der sogenannten *Kolbenhaare* befinden sich in der Telogenphase. Die Papille erneuert sich und der Follikel regeneriert sich. Dieser Vorgang benötigt zwischen zwei und vier Monaten. Danach geht das Haar wieder in die produktive Anaphase über und der Zyklus beginnt erneut.

Durch die Erstellung eines Trichogramms lässt sich eine Aussage über den Zustand der Haare treffen. Es werden zwischen 50 und 100 Haare mit Hilfe einer Pinzette gezupft und die Haarwurzel mittels Lichtmikroskopie beurteilt. Im Normalzustand befinden sich etwa 85 % der Haare in der Anaphase, ein Prozent in der Katagenphase und etwa 13 % in der Telogenphase. Der restliche Anteil entfällt auf defekte Haare. Heutzutage müssen die Haare nicht mehr ausgezupft werden. Das klassische Trichogramm wurde vom Computertrichogramm abgelöst. Dabei wird eine kleine Stelle der Kopfhaare glatt abrasiert und nach einigen Tagen mittels einer Kamera aufgenommen. Auch so kann eine verlässliche Aussage getroffen werden [59].

### **Körperbehaarung**

Man unterscheidet beim Menschen zwischen Kopf-, Scham- und übriger Körperbehaarung. Das Kopfhaar ist oft schon bei Geburt vorhanden, muss aber nicht von bleibender Natur sein. Man nennt es dann auch *Lanugohaar* [60]. Wächst es nach, wird es als *Terminalhaar* gebildet. Dabei handelt es sich um das erwachsene, pigmentierte und kräftige Haar.

Die Körperbehaarung nennt man auch *Vellushaar* [61]. In bestimmten Regionen wird sie erst während der Pubertät ausgebildet, so zum Beispiel im Scham- und Achselbereich. Aber auch im Brustbereich (bei Männern) entwickelt sich das Haar erst in der Pubertät. Eine Ausnahme bilden die Wimpern und Augenbrauen, welche bereits von Geburt an Terminalhaar sind.

### **Inkorporation von Substanzen in die Haarmatrix**

Werden Substanzen in die Haarmatrix eingelagert, unterliegen sie einem der grundlegenden Eintragswege ins Haar. Zwei Mechanismen sind bei der Einlagerung über die Blutbahn dafür verantwortlich, dass sie auch in größeren Mengen dort verweilen bzw. akkumulieren. In der Melanozyte herrscht ein vorwiegend saures Milieu (pH 3 - 6). Ungeladene Moleküle können die

Zellmembran zwischen Extra- und Intrazellularraum der Melanozyten passieren. Handelt es sich um eine schwache Säure, bleibt sie vorwiegend ungeladen, kann also auch ungehindert wieder aus der Matrix hinausdiffundieren [62]. Im Falle einer schwachen Base wird diese nach Passieren der Zellmembran protoniert. Als geladene Substanz kann sie nicht mehr über die lipophile Zellmembran diffundieren (Abbildung 5). Sie ist regelrecht „gefangen“ [63]. Der zweite Effekt ist das Vorhandensein von Melanin in den Melanozyten. Zwei Arten von Melanin sind existent: Das *Eumelanin* und das *Phäomelanin*. Erstgenanntes ist für die Braunschwarzfärbung und zweites für die rötliche Pigmentierung des Haares verantwortlich. Sie werden aus Levodopa und Tyrosin gebildet und beinhalten mehrere aromatische Funktionen, aber auch Säurefunktionen. Im Falle von *Phäomelanin* ist auch Cystein an der Biosynthese beteiligt. Durch den enthaltenen aromatischen Stickstoff sind schwach basische Eigenschaften vorhanden. Substanzen können mit den Proteinstrukturen im Haar also sowohl ionische als auch Van-der-Waals-Wechselwirkungen eingehen. Vor allem protonierte und somit positiv geladene Basen gehen starke Wechselwirkungen mit negativ geladenen Säurefunktionen ein. Aus diesem Grunde lagern sich viele Substanzen in dunkel pigmentiertem Haar besser ein, als in hellem oder nicht pigmentiertem Haar. Bei Ethylglucuronid als saure Verbindung hat die Pigmentierung keinen oder nur einen untergeordneten Einfluss auf die Einlagerungsrate [29, 46] (Abbildung 5).

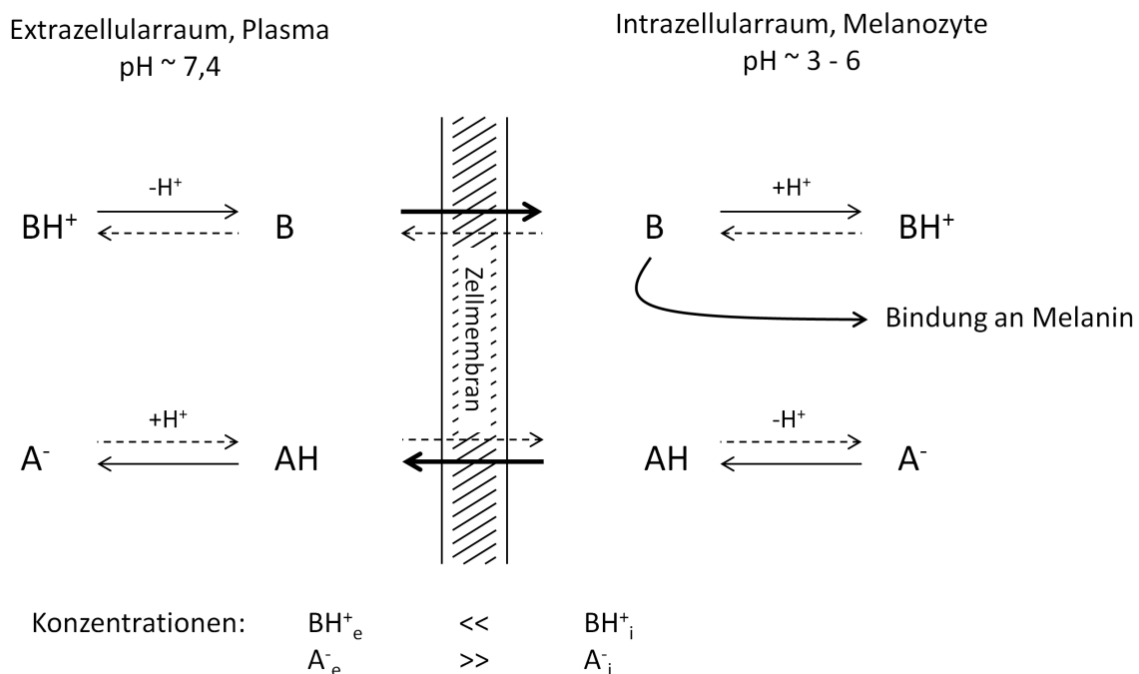


Abbildung 5: Substanzgleichgewicht im Haar

modifiziert nach Pragst et al. [62]; A: Säure;  $A^-$ : deprotonierte Säure; B: Base;  $BH^+$ : protonierte Base; e: extrazellulär; i: intrazellulär

Eine weitere Möglichkeit der Einlagerung von Substanzen ins Haar ist der Weg über den Schweiß bzw. das Sebum. Auf der Hautoberfläche gibt es etwa zwei Millionen Schweißdrüsen [50]. Da Schweiß im Wesentlichen aus Wasser und Elektrolyten besteht, kommen im Sebum neben Triglyceriden auch freie Fettsäuren, Wachse, Squalen und auch Cholesterin vor. Die Mischung von Schweiß und Sebum führt zur Bildung einer Emulsion [64-66]. So kann eine Vielzahl an hydrophilen und lipophilen Stoffen gelöst werden. Der Eintrag geschieht dann hauptsächlich in den ausgewachsenen Haarschaft. Zusätzlich zu den Einlagerungswegen über Blut, Schweiß und Sebum ist noch ein dritter Weg in Betracht zu ziehen: Externe Kontaminationen durch die Umwelt. Substanzen können in fester Form als Staub, gasförmig als Dampf oder auch flüssig als Aerosol ihren Weg zur Hautoberfläche bzw. in das Haar finden. Durch Anhaftung an dieses können sie direkt eingelagert bzw. zuvor durch Schweiß auf der Haut gelöst und

dann ins Haar eingetragen werden. Untenstehendes Schema (Abbildung 6) soll diese Zusammenhänge verdeutlichen.

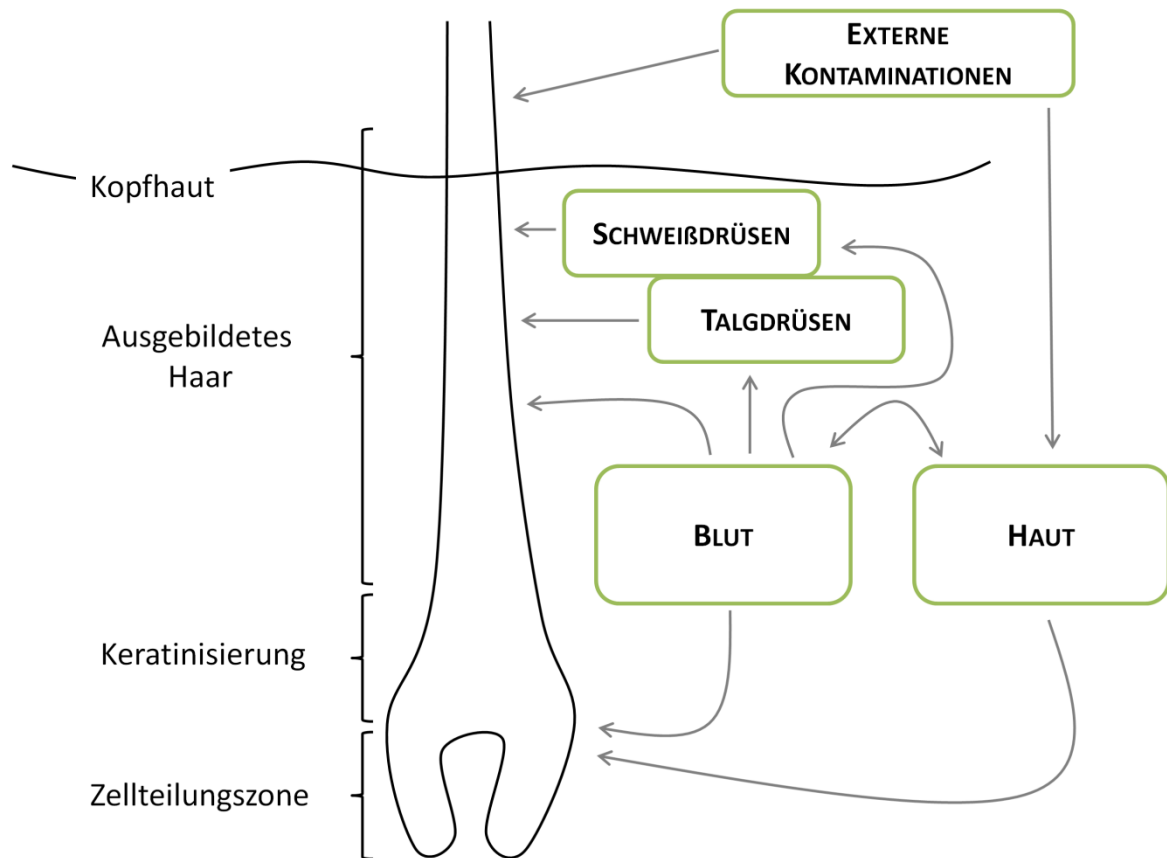


Abbildung 6: Einlagerungswege von Substanzen in die Haarmatrix  
eigene Arbeit, nach Henderson et al. [67]

Auch für EtG ist der Eintragsweg seit längerer Zeit Gegenstand der Forschung. Während einige Forschergruppen der Auffassung sind, dass EtG hauptsächlich über den Schweiß oder das Sebum ins bereits ausgebildete Haar gelangt [8, 15-17], gibt es auch Hinweise, dass EtG über die Blutbahn bei der Bildung des Haares eingelagert wird [16-19]. Beide Wege sind denkbar und sind möglicherweise sogar koexistent, wie bereits Frau Mönch im Zuge ihrer Dissertation herausgefunden hat [68]. Sogar der dritte Weg, der Eintrag über die Umwelt von außen, ist für EtG relevant. Aus Kosmetika wie z.B. Haarwässern, die EtG enthalten, können signifikante Mengen ins Haar übergehen, ohne dass Ethanol konsumiert wurde [69-72].



#### 1.4 Grenzwerte zur Klassifizierung des Alkoholkonsums

Ethylglucuronid wurde erstmals von Kamil et al. nach Ethanolinfusion beim Kaninchen beschrieben und isoliert [11] und anschließend als Alkoholmarker in Haaren zunächst von Skopp et al. [73, 74] untersucht. Es ist ausschließlich nach Alkoholkonsum detektierbar [21, 34, 75]. Die aktuell gültigen Grenzwerte zur Klassifizierung des Alkoholkonsums wurden von Liniger et al. vorgeschlagen [47]. Sie lauten:

< 7	pg/mg	Abstinenz (Gelegentliche geringe Mengen möglich)
7 - 30	pg/mg	normales Trinkverhalten (20 - 40 g Ethanol pro Tag)
> 30	pg/mg	chronisch exzessiver Konsum

Diese Cut-off-Werte sind auch von der SoHT (Society of Hair Testing) anerkannt und im 2016 aktualisierten „Consensus for the Use of Alcohol Markers in Hair for Assessment of both Abstinence and Chronic Excessive Alcohol Consumption“ enthalten [48]. Seit dem Jahre 2000 sind viele Verfahren und Analysentechniken auf der Basis der GC-MS(/MS) [10, 16, 19, 26, 29, 31, 39, 47, 70, 75-83] und LC-MS(/MS) [8, 17, 21, 27, 28, 30, 33, 34, 36, 37, 78, 84-96] beschrieben worden. Diese Verfahren wurden mit oder ohne vorhergehende Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) durchgeführt. Sie erfolgen nach Extraktion mit Wasser oder organischen Lösemitteln wie Methanol. Bei der Extraktion handelt es sich entweder um Mazeration bei Raum- oder erhöhter Temperatur, Mikrowellenaufschluss, Ultraschallaufschluss oder Mahlung [83, 96, 97].

## 2. Problem- und Zielstellung

Obwohl Ethyl- $\beta$ -D-glucuronid (weiterhin genannt Ethylglucuronid) schon seit dem Jahre 2000 Gegenstand der Forschung ist, gibt es immer noch Aspekte dieses Alkoholmarkers, die zu untersuchen erstrebenswert sind. EtG ist mittels GC-MS(/MS) und HPLC-MS(/MS) gut detektierbar, vorausgesetzt, man verfügt über entsprechend leistungsfähige Geräte (siehe Grenzwerte in Kapitel 1.4). In der vorliegenden Arbeit war die Detektion von EtG und anderen Glucuroniden mittels HPLC-MS/MS-Konfiguration vorherrschende Analysetechnik. Aspekte, die für eine sichere Quantifizierung in Haaren bedeutsam sind, sollen hier aufgeführt werden und einen Überblick über die vorliegende Arbeit geben:

- Metrologische Rückführung: Reinheit des internen Standards EtG- $d_5$
- Vergleichbarkeit von Ergebnissen zwischen Laboratorien: Durchführung von Ringversuchen, Vorbereitung von Referenzmaterialien
- Stabilität von EtG in Haarproben: essentiell für Ringversuche, Referenzmaterialien, Rückstellproben und für die Bewertung kosmetischer Einflüsse
- Beiträge zum personenspezifischen Einlagerungsverhalten

Die Grundlage eines jeden analytischen Verfahrens, bei dem der Analyt vor der Bestimmung aus einer Matrix isoliert werden muss, ist das zugrundeliegende Extraktionsverfahren. Es muss reproduzierbar und möglichst vollständig ablaufen und gleichzeitig einen hohen Probendurchsatz ermöglichen. Im besten Falle werden gleichzeitig störende Matrixkomponenten entfernt oder erst gar nicht mitextrahiert. Ein starker Fokus dieser Arbeit lag deshalb auf der Entwicklung eines solchen Verfahrens, bei dem mehrere Extraktionstechniken zum Einsatz kamen.

Neben der Extraktion ist der wichtigste Bestandteil eines Analysenverfahrens die sichere Detektion des Analyten trotz vorhandener Matrixbestandteile. Darüber hinaus sollen schnelle Analysezeiten mit niedriger Nachweis- und Bestimmungsgrenze realisiert werden. Durch die Verwendung der HPLC in Kopplung mit der Tandemmassenspektrometrie konnte ein solches Verfahren weiterentwickelt werden und stellt somit den analytischen Kern dar, welcher dieser Arbeit zugrunde liegt. Die Optimierung des Verfahrens sowie die potentielle Erweiterung zu anderen Trennmechanismen war Bestandteil der dargestellten Experimente.

Qualitätssicherung bei der Analytik von forensischen Biomarkern stellt eine wesentliche Anforderung an die angewandten Methoden. Zu diesem Zwecke wurden qualitätssichernde Maßnahmen durchgeführt, welche unter anderem die Entwicklung von Haar-Referenzmaterialien, die Stabilitätsuntersuchung von EtG unter Stressbedingungen und die Teilnahme und Mitwirkung bei den jährlichen Ringversuchen zur EtG-Bestimmung der SoHT beinhalteten. Alle durchgeführten Versuche trugen wesentlich zur Steigerung der Verlässlichkeit bei der Bestimmung von EtG in Haaren bei.

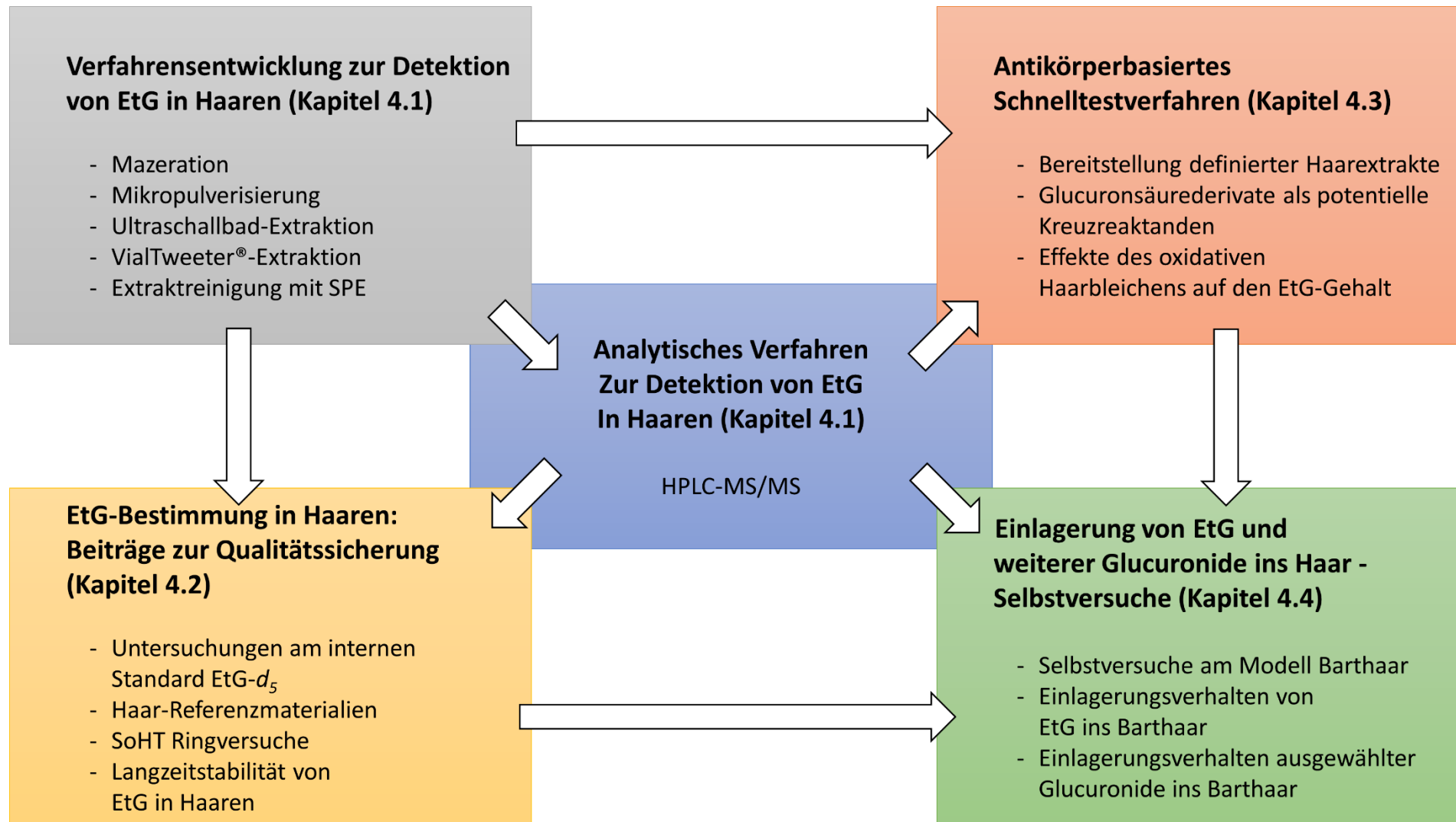
In einem ZIM-finanzierten Kooperationsprojekt<sup>6</sup> mit der Biotechnologie der Universität Potsdam und der Firma Medichem Diagnostica stand die Entwicklung und analytische Begleitung eines ELISA-basierten Schnelltestverfahrens für die Detektion von EtG in Haarextrakten im Vordergrund. Die Arbeiten beschränkten sich dabei nicht nur auf die Suche eines geeigneten Antikörperproduzenten, sondern beinhalteten auch die Herstellung definierter Haarextrakte und die Suche nach potentiellen Kreuzreaktanden, welche im finalen Assay hätten Störungen verursachen können.

Gegenstand weiterer Experimente war die Beobachtung der Einlagerung von EtG und anderen Glucuroniden in das Barthaar und deren Detektion. So konnte nicht nur die Einlagerung von EtG in Abhängigkeit der aufgenommenen Alkoholmenge dargestellt, sondern auch die von Arzneistoffglucuroniden ins Barthaar gezeigt werden.

Die vorliegende Arbeit liefert Beiträge in Bezug auf die Methodenentwicklung und Validität zur Analyse von EtG in Haaren, beleuchtet aber auch verschiedene Einflussfaktoren auf den EtG-Gehalt in Haaren. Abschließend wird durch die begleitende Analytik ein wichtiger Schritt in Richtung der Entwicklung eines ELISA-basierten Schnelltestverfahrens zur Bestimmung von EtG in der Haarmatrix geleistet.

---

<sup>6</sup> Förderkennzeichen: KF2201048SK2



### 3. Experimenteller Teil

#### 3.1 Materialien

Es waren diverse Chemikalien, analytische Standards, Verbrauchsmittel und Laborgeräte notwendig, um alle Experimente in dieser Arbeit durchführen zu können. Eine Auflistung soll in den folgenden Kapiteln stattfinden.

##### Chemikalien

Tabelle 1 zeigt alle verwendeten Chemikalien. Dazu gehörten neben Fließ- und Lösemitteln auch sog. *Modifier*, welche zur Einstellung von Eluenten verwendet wurden, ebenso Reagenzien, Puffer und Derivatisierungsmittel.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Reinheitsgrad</i>	<i>Hersteller</i>
Acetonitril	HPLC grade	VWR International
Ameisensäure	98% für MS	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumacetat	> 99% für HPLC	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumformiat	> 99% für HPLC	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumhydroxid-Lösung	> 25% für HPLC	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Dichlormethan	Picograde	LGC Standards GmbH
Methanol	Picograde	LGC Standards GmbH
Perfluorpropionsäureanhydrid (PFPA)	99%	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Salzsäure, rauchend	37%	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Trizma-Base, prim. Standard	≥ 99,9%	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Wasser	Milli-Q-Wasser Reinwasser	Millipore ELGA LabWATER
Wasserstoffperoxid-Lösung	Traceselect, 30%	Sigma Aldrich Chemie GmbH

##### Analytische Standards

Folgende analytische Standards aus Tabelle 2 fanden Verwendung.

Tabelle 2: Verwendete analytische Standards

<i>Analytischer Standard</i>	<i>Reinheitsgrad</i>	<i>Hersteller</i>
4-Acetaminophenyl-β-D-glucuronid-Natriumsalz	k.A.	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH
Acetylsalicylsäure-acyl-β-D-glucuronid	k.A.	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH
Carvedilol-β-D-glucuronid	k.A.	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH
Clopidogrel-β-D-glucuronid	k.A.	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH
Cotinin-β-D-glucuronid	k.A.	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH
Ethyl-β-D-glucuronid	k.A.	Medichem Diagnostica GmbH
Ethyl-β-D-glucuronid- <i>d</i> <sub>5</sub>	k.A.	Medichem Diagnostica GmbH
Kaffeensäure-3-β-D-glucuronid	k.A.	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH
Kaffeensäure-4-β-D-glucuronid	k.A.	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH
Phenyl-β-D-glucuronid	min. 98%	CHEMOS GmbH
Propofol-β-D-glucuronid-Natriumsalz	k.A.	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Quercetin-3-β-D-glucuronid	k.A.	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Serotonin-β-D-glucuronid	k.A.	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH

## Laborgeräte

Die in Tabelle 3 dargestellten Laborgeräte waren unter anderem für die Wägung, Erhitzung, Extraktion, Mischung, Homogenisierung und Analyse von Haarextrakten oder -pulvern nötig.

Tabelle 3: Eingesetzte Laborgeräte

Laborgeräte	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	AT261 Delta Range	Mettler Toledo, Columbus, USA
FTIR	IFS66v FTIR vacuum spectrometer	Bruker, Ettlingen, Germany
GC-MS-System	7890A Gas Chromatograph / 5975C single quadrupole mass spectrometer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Gefriertrocknungsanlage	LYOVAC GT 2/GT 2-E	FINN-AQUA, Hürth, Germany
Heizblock	Reacti-Therm III Heating module + Reacti-VAP-III Evaporation module	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPLC-MS/MS-System	<u>HPLC-System</u> 1200 series HPLC binary pump system gekoppelt mit Autosampler und Entgasungsanlage	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
	<u>Triple-Quad-System</u> API 4000 Q-Trap high performance hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer	Applied Biosystems/MDS SCIEX, Foster City, CA, USA/Concord, Ontario, Canada
Muffelofen	B150	Nabertherm, Bremen, Germany
pH-Meter	ph 539	WFW, Weilheim, Germany
Pipetten	# 1 100 – 1000 µL, Reference # 2 10 – 200 µL, Reference # 3 0,1 – 2,5 µL, Research plus # 4 Multipette stream®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotationsmischer	REAX20	Heidolph, Schwabach, Germany
Schwingmühle	MM 400	Retsch, Haan, Germany
Siebturm	AS 200 control+ Sieb 200 x 25 mm, 100 µm Maschenweite	Retsch, Haan, Germany
Über-Kopf-Schüttler	PTR-35 rotator mixer	Grant instruments, Cambridge, UK
Ultramikrowaage	UMT2	Mettler Toledo, Columbus, USA
Ultraschallbäder	# 1 Sonorex RK100 # 2 Transsonic Digital S TP680DH	Bandelin, Berlin, Germany Elma, Singen, Germany
VialTweeter®	UP200St Ultraschallgenerator S26d11x10 Sonotrode	Hielscher Ultrasonics, Berlin, Germany
Vortex-Einheit	Vortex-Genie 2	Scientific industries inc., NY, USA
Zentrifuge	MiniSpin® centrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Germany

### Einsatz unterschiedlicher Trennsäulen

Die nachfolgend beschriebenen Säulen dienen zur Methodenentwicklung und Durchführung von Routineanalysen. Siehe dazu Tabelle 4.

Tabelle 4: Verwendete chromatografische Säulen

Chromatografische Säulen	Bezeichnung	Hersteller
# 1	Hypercarb 100 x 2,1 mm, 3 µm + 10 x 2,1 mm, 3 µm Vorsäule	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
# 2	Synergi® Hydro-RP 250 x 2,0 mm, 4 µm	Phenomenex, Aschaffenburg
# 3	XTerra Phenyl 150 x 3,9 mm, 3,5 µm + XTerra Phenyl 20 x 3,9 mm, 3,5 µm Vorsäule	Waters, Massachusetts, USA
# 4	Kinetex HILIC 100 x 2,1 mm, 2,6 µm + HILIC SecurityGuard ULTRA 2,0 x 2,1 mm	Phenomenex, Aschaffenburg

## 3.2 Methoden

Im hier präsentierten Methodenteil findet eine Auflistung und Beschreibung aller Methoden statt, die zur Durchführung der Experimente notwendig waren.

### 3.2.1 Extraktion von EtG und anderer Glucuronide aus der Haarmatrix

#### Mazeration

Bei der Mazeration handelt es sich um ein publiziertes Verfahren nach Mönch et al. [82]. Etwa 50 mg Haare werden genau ausgewogen und in ein 2-mL Eppendorfgefäß mit Deckel überführt. Im ersten Waschschrift wird zur Entfernung von anhaftendem Fett und Talk die Probe mit 1 mL Dichlormethan (DCM) überschichtet und anschließend für 15 min über-Kopf geschüttelt. Danach wird das Dichlormethan mit Hilfe einer Eppendorf Reference Pipette (100 – 1000 µL) entfernt. Im zweiten Waschschrift gibt man 1 mL Methanol (MeOH) hinzu, welcher sofort wieder mit o.g. Pipette entfernt wird, da sich EtG auch in MeOH löst. Die so entfettete Probe lässt man bei Raumtemperatur durch Stehenlassen des Eppendorfgefäßes mit geöffnetem Deckel unter einem Abzug über Nacht trocknen. Am nächsten Tag wird die Probe mit 500 µL Extraktionsmittel versetzt. Dieses besteht zu 450 µL aus Reinwasser und 50 µL einer internen Standard-Lösung (pentadeuteriertes EtG, EtG- $d_5$ ) in Reinwasser. Die Extraktion erfolgt nach Mischen durch Stehenlassen des Eppendorfgefäßes mit geschlossenem Deckel bei Raumtemperatur für 48 Stunden. Im Anschluss wird der Überstand der Probe aufgenommen und durch einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter aus regenerierter Zellulose filtriert. Dieser Schritt dient der Entfernung von partikulären Verunreinigungen in der Lösung.

#### Mikropulverisierung

In Anlehnung an Mönch et al. [83] wurde ein Verfahren zur gleichzeitigen Mahlung von Haarproben und Extraktion von EtG eingeführt und modifiziert. Einwaage und Waschung wurden analog zur *Mazeration* ausgeführt. Die Probe wird mit 600 µL Extraktionsmittel, bestehend aus 550 µL Reinwasser und 50 µL einer ISTD-Lösung (EtG- $d_5$ ) in Reinwasser, versetzt. Zusätzlich werden zwei Mahlkugeln aus rostfreiem Edelstahl mit einem Durchmesser von je 5 mm hinzugefügt. Das Eppendorf-Gefäß wird in eine Polytetrafluorethylen-Halterung (PTFE, Abbildung 7) eingebracht und diese dann in einer Schwingmühle (MM 400, Retsch) eingespannt. Die Mahlung der Haarmatrix mit gleichzeitiger Extraktion des EtGs findet innerhalb von 30 Minuten bei einer Frequenz von 30 Hz statt. Nach der Extraktion wird die nass gemahlene Haarmatrix für 20 min bei 13.000 Umdrehungen pro Minute (rounds per minute, rpm) in einer MiniSpin® Zentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Filtration erfolgt analog der Mazeration.

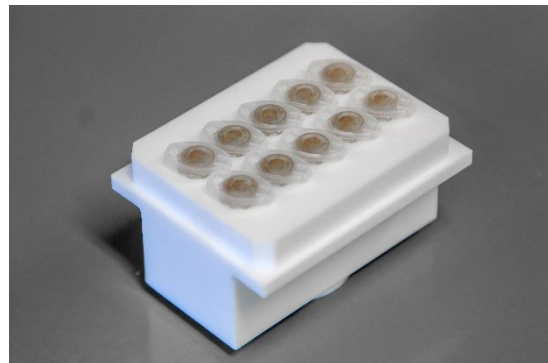


Abbildung 7: EtG-Proben zur Extraktion in einem PTFE-Halter

#### Extraktion im Ultraschallbad

Gewaschene und eingewogene Proben (siehe Abschnitt *Mazeration*) werden mit 450 µL Reinwasser und 50 µL ISTD-Lösung vermischt. Die 2-mL-Eppendorfgefäße mit Deckel werden anschließend in ein 8 x 4 Gefäße fassendes Probenrack gestellt. Dieses wird in den Drahtkorb eines Ultraschallbades (Transsonic Digital S) eingebracht und der Füllstand mit vollentsalztem Wasser so eingestellt, dass sich die Eppendorfgefäße bis auf den Bereich des Deckels vollständig unter Wasser befinden. Die Gefäße werden von oben zusätzlich mit Gewichten beschwert, um ein Aufschwimmen zu verhindern. Die Proben werden mit voller Leistung des Ultraschallbades behandelt und jeweils nach 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 Stunden entfernt und getrennt von den anderen Proben analysiert. Die Proben werden gegen eine Referenz mit HPLC-MS/MS analysiert (Referenz: Kap. 4.2.2; HPLC-Verfahren: Kap. 4.1.6).

## Extraktion durch Direktkontaktultraschall im VialTweeter®

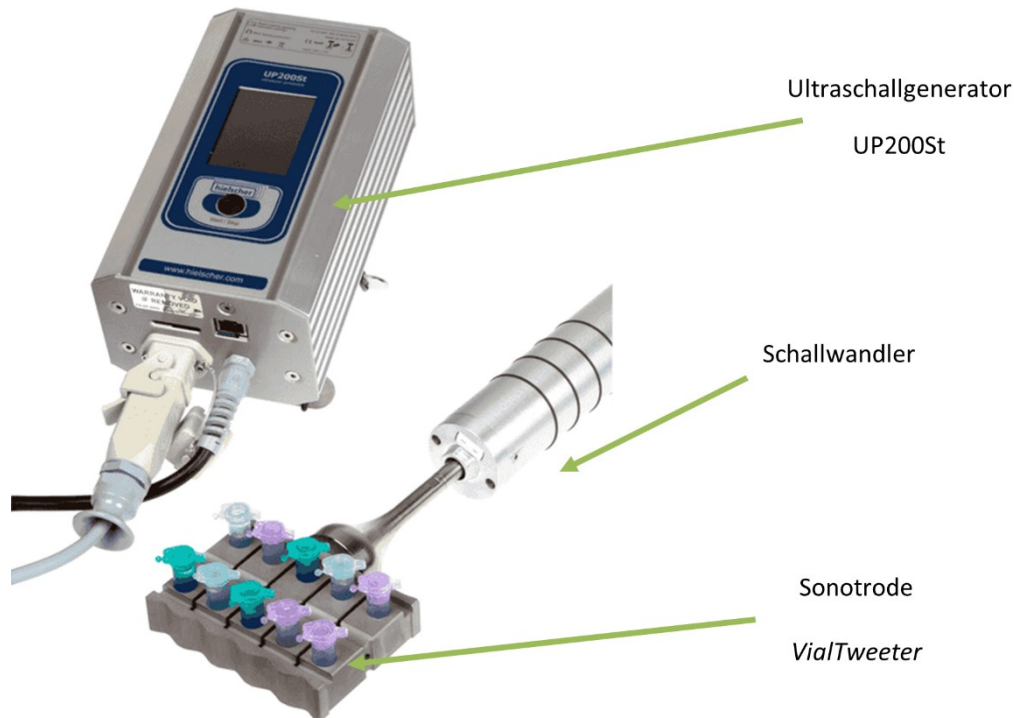


Abbildung 8: Aufbau des VialTweeters mit Ultraschallgenerator, Schallwandler, Sonotrode und eingefügten Eppendorfgefäßen <sup>7</sup>

Beim Hielscher VialTweeter® handelt es sich um einen Ultraschallgenerator, welcher über einen Schallwandler mit einer Sonotrode gekoppelt ist. Er liefert bis zu 200 Watt an Ultraschallleistung bei einer fest eingestellten Arbeitsfrequenz von 26 kHz. Das Besondere an diesem Gerät ist die Tatsache, dass die zu beschallenden Proben direkt im Eppendorfgefäß eingebracht werden. Somit entfällt Wasser als vermittelndes Medium zwischen Ultraschallwandler und eigentlicher Probe. Die Energie soll innerhalb der in Abbildung 8 dargestellten Sonotrode gleichmäßig auf alle besetzten Positionen verteilt werden (laut Hersteller bis zu 10 Watt pro Position). Bis zu 10 Eppendorfgefäße können so gleichzeitig beschallt werden. Bei den gezeigten Versuchen (Kapitel 4.1.4) war die Sonotrode mit fünf Proben und fünf Gefäßen bestückt, in welchen sich nur Wasser befand. Eines dieser Gefäße wurde verwendet, um die Temperatur mit Hilfe des mitgelieferten Thermometers zu überwachen.

Gewaschene und eingewogene Proben (siehe *Mazeration*) werden mit 550 µL Reinwasser und 50 µL ISTD-Lösung in 2-mL-Eppendorfgefäßen vermischt. Die 2-mL-Eppendorfgefäße mit Deckel werden dicht verschlossen in die Sonotrode des VialTweeters® eingebracht und festgedrückt. Die Extraktion erfolgt durch Beschallen mit einer der drei im Folgenden aufgeführten Methoden. Die Extraktionszeit beträgt bis zu 120 min.

<sup>7</sup> ©Hielscher Ultrasonics GmbH / [www.hielscher.com/VT](http://www.hielscher.com/VT) (letzter Zugriff am 18.07.2016)



Tabelle 5: Ultraschallprogramme bei Verwendung des VialTweeters®

	Programm 1	Programm 2	Programm 3
Amplitude (A)	70 %	100 %	45 %
Cyclecount (C)	40 %	20 %	100 %

Amplitude (%): Prozentualer Anteil der maximalen zuführbaren Energie

Cyclecount (%): Einschaltdauer pro Sekunde; z.B. 40 % bedeutet:  
400 ms eingeschaltet, 600 ms ausgeschaltet

### Haarextraktreinigung mittels Festphasenextraktion

Alle Experimente werden mit 50 µL einer EtG-Lösung der Konzentration  $c = 10,8 \text{ pg/mg}$  in Reinwasser durchgeführt, wenn nicht anders deklariert. Die SPE-Kartuschen werden dabei nach Herstellervorschrift behandelt. Dies bezieht sich insbesondere auf Equilibrierung und die zwischen den einzelnen Schritten durchgeführten Trocknungsschritte. Quantifizierung erfolgt nur, wenn im Beladungs- und Waschschrift kein EtG detektierbar ist. Vor der Analyse werden die Extrakte aus den einzelnen Schritten vorsichtig bei Raumtemperatur (RT) unter sanftem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft und mit 500 µL Reinwasser wieder gelöst.

### 3.2.2 Bestimmung des Anteiles von EtG im eingesetzten internen Standard EtG- $d_5$

#### Herstellung der Phenylglucuronidlösung (PhG) als interne Standard-Lösung

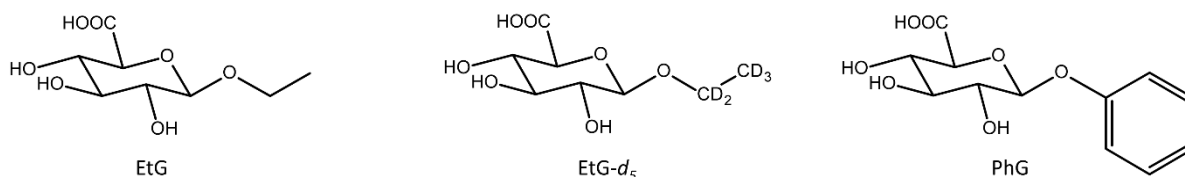
##### Stammlösung

PhG-Einwaage:	3,217 mg *
Einwaage Reinwasser:	321,2 mg
Gesamteinwaage:	324,4 mg

Resultierende Konzentration  
der Stammlösung:

9,916 mg/g

\* Einwaage mit Ultramikrowaage, Genauigkeit  $\pm 1 \mu\text{g}$

Abbildung 9: Strukturformeln von Ethylglucuronid, Ethylglucuronid- $d_5$  und Phenylglucuronid

Basierend auf der beschriebenen Stammlösung konnte durch Verdünnung eine PhG-Lösung erhalten werden, welche als interne Standardlösung den Proben zugesetzt werden konnte (Tabelle 6).

Tabelle 6: Herstellung der internen Standardlösung Phenylglucuronid

Verdünnungs- schritt	Einwaage d. Lösung [mg]	Einwaage Lösung + Wasser [mg]	Einwaage Wasser [mg]	Resultierende Konzentration [pg/mg]
Nr. 1	9,9	997,3	987,4	98252
Nr. 2	9,8	999,7	989,9	963
Nr. 3 = interner Standard	249,45	4999,6	4750,15	48

### Herstellung der EtG-*d*<sub>5</sub>-Probenlösung

Einwaage EtG- <i>d</i> <sub>5</sub> :	0,592 mg *
Einwaage Reinwasser:	509,6 mg
Gesamteinwaage:	510,2 mg

-----  
Resultierende Konzentration  
der Stammlösung: 1,0 mg/g

\* Einwaage mit Ultramikrowaage, Genauigkeit  $\pm 1 \mu\text{g}$

In Tabelle 7 sind die benötigten Verdünnungsschritte zum Erhalt der EtG-*d*<sub>5</sub>-Probe aufgezeigt.

Tabelle 7: Herstellung der EtG/EtG-*d*<sub>5</sub>-Probe

Verdünnungs- schritt	Einwaage d. Lösung [mg]	Einwaage Lösung + Wasser [mg]	Einwaage Wasser [mg]	Resultierende Konzentration [pg/mg]
Nr. 1	100,4	1000,5	900,1	100311
Nr. 2 (Untersuchungslösung)	101,1	999,6	898,5	10147

### Herstellung der zu vermessenden Probe

Es wurden vier Aliquote der Untersuchungslösung mit je 50 mg zusammen mit 50 mg der internen Standardlösung des Phenylglucuronids eingewogen und mit Reinwasser zu 500 mg aufgefüllt. Analyse erfolgte mittels HPLC-MS/MS (Kap. 4.1.6).

### Fazit

Die Probe zur Feststellung des Verunreinigungsgrades von EtG-*d*<sub>5</sub> durch EtG wurde durch Aufnehmen einer Einwaage von 0,5092 mg EtG-*d*<sub>5</sub> in 509,58 mg Reinwasser hergestellt. Durch Verdünnung wurde die Probe mit einem EtG-*d*<sub>5</sub>-Gehalt von 10147 pg/mg erhalten. Die Analyse erfolgte unter Zuhilfenahme der vorhandenen EtG-Kalibratoren (Kap. 3.3.1) mit  $\beta$ -D-Phenylglucuronid als internem Standard.

### 3.2.3 Herstellung von Referenzmaterialien: Einzelspendermaterialien und Haarpoools

Haarproben von Einzelhaarspendern (Einzelspendermaterialien, ESM) und das Ausgangsmaterial zur Herstellung der Haarpoools (HP) bildeten die Basis für systematische Untersuchungen. Dabei wurden nur anonymisierte Proben von männlichen Probanden angenommen und verarbeitet.

Die Haarpoools HP-1 bis HP-3 waren bereits Gegenstand einer vorhergehenden Dissertation (Mönch, 2014). Es erfolgte eine erneute Überprüfung der Homogenität. Die Haarpoools HP-4 und HP-5 sowie die vorgewaschenen Varianten (Zusatz „w“, siehe Kapitel 4.2.2) wurden aus demselben Ausgangsmaterial hergestellt, wie die bestehenden Haarpoools 1 - 3, jedoch nicht durch trockenes Zerkleinern, sondern durch vorheriges Anfeuchten und anschließendes Homogenisieren (siehe dieses Kapitel unten).

### Zerkleinerung von Haarsträhnen – trockenes Haar

In Strähnen vorliegende Haarproben werden auf Sicht zu Abschnitten von ca. 1-2 cm Länge zerkleinert. Die Haare werden längs nebeneinander angeordnet und mittels einer Friseurschere in Fragmente von ca. 1-2 mm Länge zerteilt. Die Beschreibung dieses Verfahrens erfolgt der Vollständigkeit halber wegen der Verwendung von Haarpool 1 bis 3. Alle weiteren hergestellten Referenzmaterialien in dieser Arbeit entstanden durch die Zerkleinerung angefeuchteter Haarsträhnen.

### Zerkleinerung von Haarsträhnen – angefeuchtetes Haar

In Strähnen vorliegendes Haarmaterial wird längs nebeneinander angeordnet und mit Reinwasser leicht angefeuchtet. Auf einem handelsüblichen Küchenbrett aus Kunststoff werden die Strähnen mit Hilfe eines Keramikmessers in Abschnitte von ca. 1-2 mm Länge zerkleinert. Anschließend werden die noch feuchten Haarabschnitte, wie im Kapitel 3.2.4 beschrieben gefriergetrocknet.

### Siebung zerkleinerter Haarproben

Geschnittene und getrocknete Haarabschnitte aus Einzelspendermaterialien oder gepoolten Materialien werden gesiebt, um Haarteile kleiner als ca. 1 mm und größer als ca. 2 mm zu entfernen. Dieses geschieht durch mehrmaliges Sieben durch ein 100-µm-Sieb auf einem Siebturm (AS 200 control+). Die Siebzeiten unterscheiden sich, je nachdem, wie die Materialien zerkleinert werden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Siebzeiten von trockenen und geschnittenen Haarmaterialien

Schneidetechnik	<u>Trocken</u>	<u>Angefeuchtet</u>
Siebschritte auf 100 µm-Sieb	6 x 15 Minuten	2 x 15 Minuten
	2 x 10 Minuten	1 x 10 Minuten
	2 x 9 Minuten	

### Homogenisierung von Haarproben – trockenes Verfahren

Zerkleinerte Haarproben werden in ein verschraubbares Weithalsglasgefäß (ein Liter Fassungsvermögen) mit Schraubverschluss gefüllt. Anschließend rotiert dieses Gefäß für 100 Stunden auf einem Rotationsmischer (REAX20) bei 10 rpm. Nach Beendigung des Mischverfahrens wird die Probe entnommen und in 50 mL-Glasgefäßen mit Schraubverschluss bei Raumtemperatur gelagert.

### Homogenisierung von Haarproben – Dispersionsverfahren

Diese Homogenisierungsmethode findet ausschließlich bei den Haarpools HP-4-w und HP-5-w Verwendung. Während im Normalfall jede Analysenprobe (typisch: etwa 50 mg) einzeln im Eppendorf-Gefäß gewaschen wird (Kapitel 3.2.1), wird hier ein Teil des zerkleinerten und homogenisierten Materials abgefüllt und in seiner Gesamtheit in einem Becherglas gewaschen. Im Falle von HP-4-w sind das 10 g des gesiebten Haarpools HP-4. Es werden 200 mL Dichlormethan zugegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers 15 Minuten gerührt. Danach saugt man über einen Glassintertiegel ab und gibt 200 mL Methanol hinzu, welcher sofort wieder entfernt wird. EtG ist in Dichlormethan nicht löslich, jedoch aber in MeOH. Die so entstandenen gewaschenen Haarpools HP-4-w und HP-5-w werden anschließend im Glassintertiegel im Abzug getrocknet und am folgenden Tag abgefüllt.

### 3.2.4 Lyophilisation

Nasses Trocknungsgut wird in einem sauberen Glasgefäß durch Aufbringen von Parafilm® auf die Öffnung vor Herausfallen und Verschmutzung von außen geschützt. Der Parafilm® wird mit Hilfe einer Kanüle Gr.1 mehrfach eingestochen, um einen Gasaustausch zwischen dem Gefäßraum und der Umgebung zu gewährleisten. Bei -28 °C friert man das Trocknungsgut mindestens 12 Stunden lang ein und trocknet in einer Gefriertrocknungsanlage (Lyovac GT 2/GT 2-E Lyophilisator, Finn-Aqua). Nach 24 Stunden wird der Trocknungszustand durch Abkopplung der Trocknungskammer von der Vakuumpumpe überprüft. Steigt der Druck in der Trocknungskammer weist das auf sublimierendes Eis hin. In diesem Falle muss weitergetrocknet werden, bis keine Druckänderung mehr feststellbar ist. Nach Beendigung des Trocknungsvorganges werden die Proben entnommen.

### 3.2.5 Künstliche Oxidation von Haarproben

Zur Evaluierung des Einflusses von oxidierenden Bleichmitteln auf den EtG-Gehalt in Haaren war die Einstellung diverser Lösungen und Puffer notwendig. Dieses Kapitel beschreibt die Herstellung der verwendeten Lösungen, den Versuchsaufbau zur oxidativen Behandlung von Haarmaterialien und den Testaufbau für einen zerstörungsfreien Schnelltest zur Detektion oxidierter Spezies in der Haarmatrix.

#### A) Herstellung von Bleichmitteln

##### **Bleichmittel A: 10 % Wasserstoffperoxid**

Bleichmittel A besteht aus 10 % Wasserstoffperoxid in Reinwasser. Es wird durch Verdünnung von Wasserstoffperoxidlösung (30 %) hergestellt.

##### **Bleichmittel B: 10 % Wasserstoffperoxid in 50 mM Tris-HCl, pH 8,3**

Bleichmittel B besteht aus 10 % Wasserstoffperoxid in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,3. Der Tris-HCl-Puffer wird durch Lösen einer Menge von Trizma®-Base in Reinwasser und Zugabe der äquimolaren Menge an Salzsäure zu einer Konzentration von 0,1 M hergestellt. Tris-HCl-Puffer und Wasserstoffperoxidlösung 20 % werden volumetrisch im Verhältnis 1:1 (V/V) miteinander gemischt und ergeben die Endkonzentrationen von 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 50 mM Tris-HCl-Puffer.

##### **Bleichmittel C: 10 % Wasserstoffperoxid in 50 mM Tris-HCl, pH 10,0**

Bleichmittel C besteht aus 10 % Wasserstoffperoxid in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 10,0. Die Herstellung erfolgt analog zu Bleichmittel B, jedoch wurde der Tris-HCl-Puffer vorher mit Ammoniumhydroxidlösung (> 25 %) auf pH 10,0 eingestellt.

#### B) Oxidative Behandlung von Haarmaterialien

Haarmaterialien werden nach dem Waschen (s. Punkt 3.2.1) in den Eppendorfgefäßen belassen und mit einer der drei Bleichlösungen versetzt. Die Einwirkzeiten der Bleichmittel betragen 10, 30, 45 und 60 Minuten. Nach dem Einwirken werden die Proben für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert und dreimal mit 1 mL Reinwasser gewaschen, um möglichst viel der Bleichmittlrückstände zu entfernen. Um eine weitere Oxidation der Haare zu vermeiden, werden die Proben zusammen mit den Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und der Inhalt anschließend gefriergetrocknet (Kapitel 3.2.4). Dieser Vorgang entzieht den Haarproben nicht nur einen großen Teil des anhaftenden Wassers, sondern auch des Wasserstoffperoxids. Somit wird die Reaktion wirkungsvoll gestoppt.

#### **Nachweis von Cysteinsäure als Oxidationsprodukt in der Haarmatrix**

Haarproben werden vor und nach der Behandlung pulverisiert und auf einem Golden-Gate®-ATR-Kristall eines Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometers (Bruker IFS66v) aufgebracht. Unter Vakuum erfolgen für jede Probe 2000 Hintergrundscans und 2000 Probenscans zwischen 4000 und 600 cm<sup>-1</sup>. Die Auflösung beträgt 2 cm<sup>-1</sup>. Nach Subtraktion der Hintergrundscans wurden so aussagekräftige Spektren generiert (mit Origin 9.0). Cysteinsäure kann als Oxidationsprodukt des in den Haaren enthaltenen Cystins bei 1040 Wellenzahlen detektiert werden. Diese Bande entspricht der symmetrischen Streckschwingung der S-O-Bindung und ist in der Literatur gut dokumentiert [98-100].

#### **Trockenes Mahlen von Haarproben für die ATR-FTIR-Bestimmung**

Die für die Analytik von Haarmaterialien notwendige Pulverisierung kann durch die Mahlung mittels einer geeigneten Mühle erreicht werden. Ca. 60 mg Haarmaterial werden in dicht verschließbare 5-mL-Edelstahl-Mahlbecher mit zwei 5-mm-Stahlkugeln eingebracht. Nach Versprödung der Haarmaterialien durch Kühlung der geschlossenen Mahlbecher für mindestens drei Minuten mit flüssigem Stickstoff (Siedepunkt -169 °C) folgt die eigentliche Mahlung in einer MM 400-Schwingmühle

der Firma Retsch. Innerhalb von 10 Minuten pulverisiert das Haarmaterial bei 30 Schwingungen pro Sekunde.

### **3.2.6 Langzeitstabilität von EtG in Haaren**

Zur Überprüfung der Langzeitstabilität von EtG in Haaren werden zwei verschiedene Haarmaterialien (Material 1, inkorporiert  $\triangleq$  *Medichem-1* und Material 2, authentisch  $\triangleq$  *Medichem-6* aus Kapitel 4.2.2) der Fa. Medichem Diagnostica bei Lagertemperaturen zwischen -22 °C und +60 °C für Zeiträume zwischen einem Monat und zwei Jahren eingelagert. Authentisches Material bedeutet, dass EtG natürlich nach Alkoholkonsum beim Wachstumsprozess eingelagert wurde. Inkorporiertes Haar bedeutet, dass ein authentisches Haar mit niedrigem EtG-Gehalt künstlich durch EtG-Eintrag von außen auf einen bestimmten Gehalt eingestellt wird. Nach Beendigung der Einlagerung bei den festgelegten Temperaturen und Zeiträumen erfolgte die Rücklagerung der Behältnisse zu den Referenzproben bei -22 °C. Die Extraktion findet jeweils nach Ende eines Lagerjahres mittels *Mikropulverisierung* statt. Das angewendete Analysenverfahren ist HPLC-MS/MS. Für jede Lagerbedingung existieren vier Aliquote derselben Probe. Ein Probenregime, aus dem ersichtlich ist, wie viele Proben bei welchen Temperaturen eingelagert werden, ist in Kapitel 4.2.4 aufgeführt.

### 3.3 Chromatografische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung von Kalibratoren, Qualitätskontrolllösungen und internem Standard zur Bestimmung von EtG in Haarextrakten

EtG im Haarextrakt kann unter Zuhilfenahme einer Lösungsmittelkalibrierung (EtG in Lösungsmittel, hier: Wasser) bestimmt werden. Zu diesem Zweck erfolgt die Herstellung von 14 Kalibrator-Stammlösungen im Bereich von 1 bis 800 pg/mg, von welchen fünf bis sieben Punkte in äquidistanten Abständen für eine Kalibrierkurve eingesetzt werden. In Analogie zu der durchschnittlichen Probenmasse von ca. 50 mg werden auch hier 50 mg der finalen Kalibrierlösung zusammen mit 50 mg ISTD-Lösung eingewogen und mit Reinwasser in Abhängigkeit der Extraktionsmethode verdünnt. Für die *Mazeration* bedeutet das eine Zugabe von 400 mg, für die *Mikropulverisierung* eine Zugabe von 500 mg Wasser. Alle Schritte werden gravimetrisch erfasst, um eine höchstmögliche Genauigkeit bei der Erstellung der Lösungen zu gewährleisten. Sowohl Kalibrier- als auch interne Standardlösungen werden in kleinen Aliquoten (typisch ca. 1000 µL) in Autosamplervials abgefüllt und dicht verbördelt bei -22 °C gelagert. So sind bei Bedarf neue Aliquote schnell verfügbar. Angebrochene Vials werden im Kühlschrank bei +4 °C gelagert.

Zur Herstellung der Kalibrierlösungen, Qualitätskontrolllösungen und des internen Standards wird eine Stammlösung aus einer genau eingewogenen Menge EtG bzw. EtG- $d_5$  hergestellt. Diese Stammlösung wird wiederum weiter verdünnt, um die gewünschten Konzentrationen zu erreichen. Die Einwaagen an EtG und EtG- $d_5$  sowie die resultierenden Verdünnungen sind in Tabelle 9 und Tabelle 10 dargestellt. Der interne Standard EtG- $d_5$  wurde im Laufe dieser Arbeit zweimal aus der Stammlösung angesetzt, resultierend in zwei Konzentrationen.

Tabelle 9: Einwaagen und resultierende Stammlösungen von EtG und EtG- $d_5$

Substanz	Einwaage Substanz (mg)	Einwaage Reinwasser (g)	Konzentration der Stammlösung (pg/mg)
<b>EtG-Kalibratoren und QCs</b>			
EtG	1,9255	0,9672	1.986.843
<b>Interner Standard</b>			
EtG- $d_5$	2,0966	10,4832	199.957

Tabelle 10: Konzentrationsbereich der EtG-Standards und des internen Standards

Substanz	Kalibrierbereich (pg/mg)	Konzentration EtG- $d_5$ (pg/mg)
<b>EtG-Kalibratoren und QCs</b>		
EtG	1,0 - 798,9	-
<b>Interner Standard</b>		
EtG- $d_5$	-	99,4 / 97,0

Die resultierenden Konzentrationen der Kalibrierpunkte (KP) und Qualitätskontrolllösungen (QC) lauten wie folgt (alle Angaben in pg/mg):

KP-1: 1,0	KP-2: 2,0	KP-3: 5,0	KP-4: 10,0
KP-5: 20,1	KP-6: 39,8	KP-7: 59,6	KP-8: 80,2
KP-9: 99,6	KP-10: 151,1	KP-11: 199,8	KP-12: 399,9
KP-13: 599,3	KP-14: 798,9		
QC-Low: 6,9	QC-Med: 29,9	QC-High1: 121,6	QC-High2: 297,7

### 3.3.2 Herstellung des internen Standards zur Bestimmung von EtG aus EtG-*d*<sub>5</sub>

Die Stammlösung des internen Standards Phenyl-β-D-glucuronid · 1H<sub>2</sub>O zur Bestimmung von EtG aus EtG-*d*<sub>5</sub> wird durch Lösen von 3,4309 mg Phenyl-β-D-glucuronid · 1 H<sub>2</sub>O in 321,15 mg Reinwasser hergestellt. Dabei wird die Massendifferenz zum wasserfreien Phenyl-β-D-glucuronid berücksichtigt. Durch Verdünnung erreicht man die Endkonzentration des internen Standards von 1031 pg/mg.

### 3.3.3 Bestimmung von EtG mittels GC-MS

Das verwendete Verfahren zur Bestimmung von EtG in Haarextrakten mittels GC-MS nach negativer chemischer Ionisation (NCI) wurde von Mönch et al. adaptiert [82]. Es beinhaltet einen Derivatisierungsschritt von EtG mittels Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA) und den eigentlichen Analysenvorgang mittels GC-NCI-MS.

Durch Mazeration erhaltene Haarextrakte werden in 2-mL-Autosamplervials, bei -22 °C eingefroren und danach gefriergetrocknet. Im Anschluss setzt man 100 µL PFPA zu und heizt das verschlossene Gefäß in einem Heizblock (Reacti-Therm III Heating module) 45 Minuten lang auf 60 °C auf. Nach Ablauf dieser Zeitspanne können die derivatisierten Extrakte ohne weitere Behandlung zur Analyse ins GC-MS-System aufgegeben werden. Detaillierte Angaben zum GC-NCI-MS-System und der angewendeten Methode sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Kenndaten zur Bestimmung von EtG nach Derivatisierung mit PFPA  
Fettgedruckte Werte: Quantifizier-Ionen

<i>GC-System</i>	
Autosampler	Gerstel MPS2 XL
Injektionsvolumen	3 µL
Kaltaufgabesystem	Gerstel PTV 40°C für 0,1 min, steigend auf 300 °C mit 12 °C/min
GC-MS	7890A Gas Chromatograph / 5975C single quadrupole mass spectrometer
Analytische Säule	Agilent HP-5ms, 0,25 µM Filmdicke, 30 m x 0,25 mm
Trägergas	Wasserstoff, 1,5 mL/min
Ofenprogramm	40 °C für 3 min, steigend auf 200 °C mit 7 °C/min und danach mit 20 °C/min auf 280 °C
Transfer-line	280 °C
Temperatur Ionenquelle	150 °C
Temperatur Quadrupol	150 °C
Ionisationsmodus, Reaktionsgas	NCI mit Methan, 0,6 mL/min
SIM-Massen	EtG-Derivat: <b>496</b> , 347 EtG- <i>d</i> <sub>5</sub> -Derivat: <b>501</b> , 352

### 3.3.4 Bestimmung von EtG und weiterer Glucuronide mittels HPLC-MS/MS

Gewonnene Haarextrakte werden nach Filtration ohne weitere Derivatisierung oder Aufarbeitung zur Analyse direkt injiziert. Neben einem modifizierten Verfahren nach Mönch et al. [97], bei welchem das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert wurde, werden zwei weitere Methoden zur Auftrennung von EtG von der restlichen Matrix auf sogenannten *Reversed-Phase*-Säulen präsentiert. Bei einem dieser Säulenmaterialien handelt es sich um ein C<sub>18</sub>-derivatisiertes Material mit polarem Endcapping, bei dem anderen um eine Phenyl-derivatisierte Phase. Ebenso wurde eine Normalphase betrachtet. Diese alternativen Methoden und die dazugehörigen Ergebnisse sind im Anhang zu dieser Arbeit (A-2) dargestellt.

### Bestimmung von EtG nach Trennung auf Thermo Fisher Hypercarb

EtG kann mittels HPLC-MS/MS nach Trennung auf einer Thermo Fisher Hypercarb-Säule wie folgt analysiert werden. Alle Kenndaten zu den Einstellungen des Massenspektrometers sind in Tabelle 12 angegeben.

50 µL Haarextrakt werden unter Verwendung von analytischer Säule #1: Thermo Fisher Hypercarb in das beschriebene HPLC-MS/MS-System injiziert (Kapitel 3.1). Die Säulentemperatur beträgt konstant 30 °C. Beim Fließmittel handelt es sich um Wasser/Acetonitril im Volumen-Verhältnis 93/7 bei 10 Minuten Laufzeit. Das LC-Programm lautet wie folgt:

Zeit (min)	Flussrate (µL/min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0.00	300	100	0
10.00	300	100	0

Tabelle 12: Kenndaten zur Analyse von EtG mittels HPLC-MS/MS auf Thermo Fisher Hypercarb MRM-Modus; Optimierte MS-Parameter; fett: Quantifier-Übergang)

ESI <sup>⊖</sup>	CUR (a.u.)	CAD (a.u.)	IS (V)	TEM (°C)	GS1 (a.u.)	GS2 (a.u.)	ihe	
Parameter	40	12	-4500	500	90	80	an	
	Dwell							
	Analyt	Q1	Q3	time (ms)	DP	EP	CE	CXP
Massen- übergänge	EtG	221,071	<b>74,9</b>	100	-46	-6	-24	-6
			84,9		-48	-4	-25	-6
	EtG- <i>d</i> <sub>5</sub>	225,979	<b>74,9</b>		-54	-5	-23	-6
			85,0		-49	-7	-24	-6

CUR curtain gas, CAD collision activated dissociation gas, IS ion spray voltage, TEM desolvation temperature, GS1 ion source gas 1 flow, GS2 ion source gas 2 flow, ihe interface heater, Q1 Quadrupol 1, Q3 Quadrupol 3, DP declustering potential, EP entrance potential, CE collision energy, CXP cell exit potential

### Bestimmung weiterer Glucuronide nach Trennung auf Phenomenex Synergi® Hydro-RP

Folgende Glucuronide können mittels HPLC-MS/MS nach Trennung auf einer Phenomenex Synergi® Hydro-RP-Säule analysiert werden:

(Para)	4-Acetaminophenyl-β-D-glucuronid (Paracetamol)
(Ass)	Acetylsalicylsäure-acyl-β-D-glucuronid (Aspirin)
(Kaf-3)	Kaffeesäure-3-β-D-glucuronid
(Kaf-4)	Kaffeesäure-4-β-D-glucuronid
(Carve)	Carvedilol-β-D-glucuronid
(Clopido)	Clopidogrel-acyl-β-D-glucuronid
(Coti)	Cotinin-β-D-glucuronid
(Propo)	Propofol-β-D-glucuronid
(Quer)	Quercetin-β-D-glucuronid
(Sero)	Serotonin-β-D-glucuronid

Der Nachweis dieser 10 ausgewählten Glucuronide ist von besonderer Wichtigkeit, da sie potentielle Kreuzreaktanden für den ELISA-basierten Schnelltest in Kapitel 4.3 darstellen können. Sollten diese (und andere) Glucuronide in die Haarmatrix eingelagert werden, so könnten sie durch Kreuzreaktion Störungen im Schnelltest hervorrufen. Das beschriebene Verfahren ermöglicht den simultanen Nachweis aller 10 Glucuronide in der Haarmatrix. Selbstverständlich beläuft sich die Anzahl der möglichen Kreuzreaktanden nicht ausschließlich auf diese 10 Substanzen. Sie wurden lediglich anhand



der Gesichtspunkte *relevantes Auftreten* und *leichte Verfügbarkeit* ausgewählt. Zur Validierung der Kreuzreaktivitäten des fertigen Assays (welcher zum Zeitpunkt des Endes der praktischen Phase dieser vorliegenden Arbeit Ende Februar 2016 vom Projektpartner noch nicht vorlag) müssen selbstverständlich viel mehr Substanzen gesichtet werden. Sicherlich würde man sich dabei auch zuerst auf glucuronidierte Substanzen konzentrieren, da diese durch den Glucuronsäureanteil eine hohe strukturelle Kongruenz zum Ethylglucuronid aufweisen. Alle Kenndaten zu den Einstellungen des Massenspektrometers sind in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13: Kenndaten zur Analyse verschiedener Glucuronide mittels HPLC-MS/MS MRM-Modus; Optimierte MS-Parameter; fett: Quantifier-Übergänge)

ESI <sup>⊖</sup> Parameter	CUR (a.u.)	CAD (a.u.)	IS (V)	TEM (°C)	GS1 (a.u.)	GS2 (a.u.)	ihe		
	40	12	-4500	500	90	70	an		
ESI <sup>⊕</sup> Parameter	CUR (a.u.)	CAD (a.u.)	IS (V)	TEM (°C)	GS1 (a.u.)	GS2 (a.u.)	ihe		
	10	12	4500	500	90	70	an		
Massen- übergänge	Analyt	ESI	Q1	Q3	Dwell time (ms)	DP	EP	CE	CXP
				<b>113,0</b>		-19	-4	-20	-9
	Ass	⊖	354,940	174,8	30	-21	-5	-12	-14
				136,9		-21	-7	-25	-10
	Kaf-3	⊖	354,936	<b>178,8</b>	30	-37	-6	-29	-15
				134,9		-42	-8	-48	-11
				112,9		-26	-5	-30	-9
	Kaf-4	⊖	354,953	<b>178,8</b>	30	-50	-4	-23	-15
				134,8		-40	-5	-45	-10
				112,8		-34	-5	-21	-9
	Para	⊖	325,923	<b>112,9</b>	30	-56	-7	-20	-10
				174,7		-51	-7	-16	-12
				149,9		-45	-6	-37	-12
	Propo	⊖	352,996	<b>176,9</b>	30	-61	-6	-36	-26
				112,9		-55	-6	-26	-9
				174,7		-58	-6	-19	-14
	Quer	⊖	476,970	<b>300,9</b>	30	-56	-13	-31	-12
				150,9		-42	-11	-55	-12
				178,9		-45	-9	-46	-13
	Carve	⊕	583,068	<b>407,2</b>	50	90	14	37	9
				222,1		90	12	50	15
				100,1		86	9	63	5
	Clopid	⊕	483,982	<b>308,1</b>	50	36	7	23	6
				198,2		35	6	40	14
				152,1		39	8	55	10
	Coti	⊕	352,953	<b>177,1</b>	50	36	12	28	12
				80,1		40	5	74	4
				146,0		40	4	48	8
Sero	⊕	353,025	<b>160,2</b>	50	39	9	42	10	
			336,1		44	9	25	7	
			177,2		39	10	19	13	

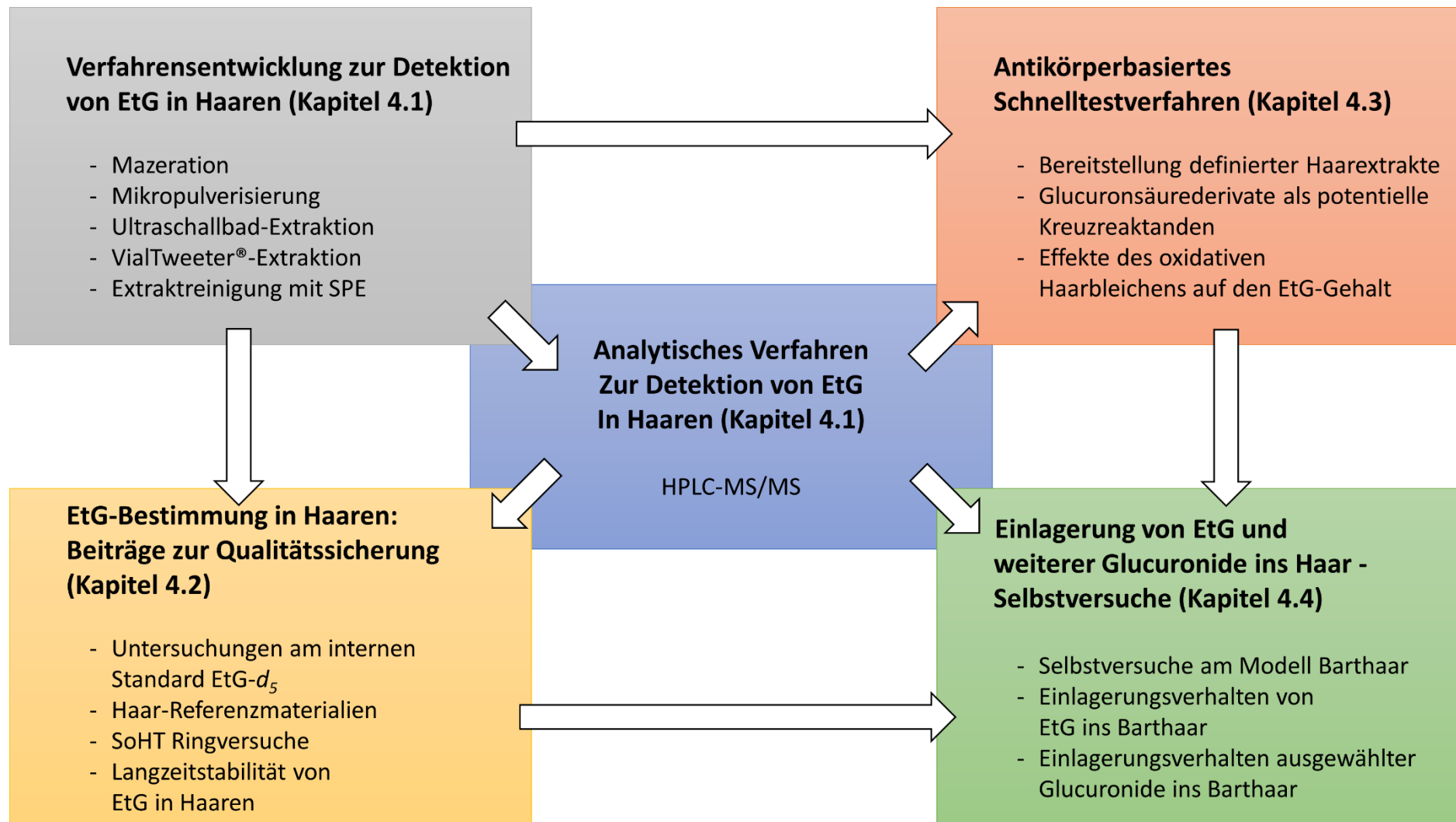
CUR curtain gas, CAD collision activated dissociation gas, IS ion spray voltage, TEM desolvation temperature, GS1 ion source gas 1 flow, GS2 ion source gas 2 flow, ihe interface heater, Q1 Quadrupol 1, Q3 Quadrupol 3, DP declustering potential, EP entrance potential, CE collision energy, CXP cell exit potential

50 µL Haarextrakt werden unter Verwendung von analytischer Säule #2: Phenomenex Synergi® Hydro-RP in das beschriebene HPLC-MS/MS-System injiziert (Kapitel 3.1). Die Säulentemperatur beträgt

konstant 30 °C. Beim Fließmittel handelt es sich um Wasser mit 0,1 % Ameisensäure und Methanol in veränderlichen Anteilen. Das LC-Programm lautet wie folgt:

<i>Zeit (min)</i>	<i>Flussrate (<math>\mu</math>L/min)</i>	<i>Eluent A (%)</i>	<i>Eluent B (%)</i>
0.00	400	98	2
1.00		98	2
12.00		0	100
15.00		0	100
16.00		98	2
20.00		98	2

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



Im vierten Abschnitt dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Forschungsarbeiten dargelegt und diskutiert. Im Wesentlichen gliedert sich der Abschnitt *Ergebnisse und Diskussion* in vier Themenkomplexe:

- Die Extraktion von EtG und die Reinigung von Haarextrakten mittels Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) sowie die Vorstellung des verwendeten Messverfahrens zur Bestimmung von EtG in Haarmatrices; mithilfe dieses Verfahrens wurden auch selbst hergestellte Haarpools und Einzelhaarproben charakterisiert
- Qualitätssichernde Maßnahmen zur Bestimmung von EtG in Haarmatrices: Untersuchungen am internen Standard, Herstellung von Haar-Referenzmaterialien, Teilnahme an offiziellen Ringversuchen der Society of Hair Testing und Untersuchungen der Stabilität des EtG in trockenen Haarmatrices unter Stressbedingungen
- Das Kooperationsprojekt *Antikörperbasiertes Schnelltestverfahren für die Bestimmung von EtG in Haar* im Rahmen des zentralen Innovationsprogrammes Mittelschicht (ZIM) mit Beiträgen zur unterschiedlichen Methodik bei der Herstellung von EtG-haltigen Haarextrakten und der Analytik und Identifizierung von Glucuronsäure-Derivaten als potentielle Kreuzreaktanden im Schnelltestverfahren
- Weiterführende Analytik zu EtG in Haaren: insbesondere die Stabilität im trockenen Haar unter Stressbedingungen und die Entwicklung eines Schnelltestes zur Identifikation von gebleichtem Haar

Dabei sind diese Abschnitte als Prozess zu verstehen. Durch die Untersuchungen der Extrahierbarkeit und der Reinigung der Extrakte mit dem verwendeten HPLC-MS/MS-Verfahren war es möglich, die vorgestellten Haarpools und Einzelhaarproben genau zu untersuchen und zu charakterisieren. Mit den qualitätssichernden Maßnahmen im zweiten Abschnitt konnte die Reproduzierbarkeit des Verfahrens sichergestellt und große Probenserien vermessen werden. Der Fokus des dritten Abschnittes lag auf dem antikörperbasierten Schnelltestverfahren. Neben der Haarextraktherstellung erfolgte auch die Untersuchung potentieller Kreuzreaktanden in der Haarmatrix. Das verwendete Analysenverfahren stand somit im Mittelpunkt vieler Fragestellungen dieser Arbeit. Die charakterisierten Haarmaterialien wurden als Grundlage der Stabilitätsversuche bei beschleunigter Alterung und bei der Beurteilung des Einflusses oxidativen Bleichens auf den EtG-Gehalt im Haar verwendet. Die gewonnenen Erkenntnisse flossen abschließend auch in den letzten Teil der Ergebnisdiskussion ein. Das gewonnene Vorwissen befähigte zu weiterführenden Experimenten. Zum einen konnte der Einfluss von Bleichmitteln auf den EtG-Gehalt in der Haarmatrix festgestellt und ein Schnelltestverfahren zur Identifizierung oxidativ behandelter Haare entwickelt werden, zum anderen erfolgte eine Serie an Selbstversuchen, die den Zusammenhang zwischen aufgenommener Alkoholmenge und eingelagerter EtG-Menge ins Haar herstellen sollte.

#### 4.1 Entwicklung eines qualitätsgesicherten Verfahrens zur EtG-Analytik in Haaren

In Teil eins der Vorstellung der gewonnenen Ergebnisse soll auf die Grundlagen der EtG-Analytik eingegangen werden. Diese beginnen bei der Extraktion des EtG aus der Haarmatrix. Sie ist auf verschiedene Art und Weise möglich. In der hier vorliegenden Arbeit wurden zwei Verfahren standardmäßig angewendet. Bei der *Mazeration* (Kap. 3.2.1) werden ganze oder in kleine Stücke geschnittene Haare (typisch ca. 1-2 mm) mit Wasser als Lösungsmittel versetzt und 48 Stunden lang extrahiert. Die Arbeiten zu dieser Extraktionsmethode wurden von Mönch et al. veröffentlicht [82]. Bei der sogenannten *Mikropulverisierung* (Kap. 3.2.1) handelt es sich um ein simultanes Mahl- und Extraktionsverfahren. Die Extraktionszeit beträgt nur 30 Minuten und ist erschöpfender als die *Mazeration*. Das Verfahren wurde ebenfalls von Mönch et al. eingeführt [83] und im Verlaufe dieser Arbeit modifiziert und optimiert, wie in Kap. 4.1.2 nachzulesen ist. Zusätzlich werden zwei weitere, experimentelle Extraktionsverfahren vorgestellt: die Extraktion durch das Einbringen einer Mazerationlösung in ein Ultraschallbad (Kap. 4.1.3) und die Ultraschallextraktion durch direkten Kontakt eines Extraktionsgefäßes mit einer Sonotrode (Kap. 4.1.4).

Die Haarextraktreinigung in Kap. 4.1.5 ist ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Analytik von EtG. Generell gilt, je freier eine Probenlösung von Matrixbestandteilen ist, desto einfacher und sicherer kann der gesuchte Analyt darin bestimmt werden. Die hier hauptsächlich verwendete HPLC-Triplequad-Massenspektrometrie bietet durch zwei als Massensfilter wirkende Quadrupole eine sehr gute Reduktion des Detektorrauschens und auch der Detektion ungewünschter Massenübergänge, ganz verhindern kann sie dies jedoch nicht. Sobald Mutterionen des gleichen Masse/Ladungsverhältnisses wie der Analyt den ersten Quadrupol passieren und möglicherweise sogar Fragmente mit dem gleichen Masse/Ladungsverhältnis wie der Analyt bilden, werden zwangsläufig Signale von Fremdstoffen detektiert. Weiterhin kann eine erhöhte Matrixbelastung zu vermehrtem Verschleiß analytischer Säulen führen. Diese Aspekte zu reduzieren ist das Ziel der durchgeführten Versuche mit der *Festphasenextraktion* (Kap. 4.1.5).

Kernstück der EtG-Analytik ist das angewendete Analysenverfahren mittels Hochdruck-flüssigkeitschromatografie-Tandemmassenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS/MS), welche nicht zuletzt wegen ihrer schnellen Analysezeiten und einfachen Probenvorbereitung genutzt wurde. Das Verfahren wurde von Mönch et al. entwickelt [97], wobei es zur Durchführung dieser Arbeit neu optimiert wurde. Dies kann in Kap. 4.1.6 genauer verfolgt werden.

Diese Grundlagen - Extraktion, Extraktreinigung und Analysenverfahren - befähigten zu der Analyse von selbst hergestellten Haarproben und Haarproben von Einzelspendern und der Beurteilung dieser hinsichtlich ihrer EtG-Gehalte und Homogenität, wie aus Kap. 4.2.2 hervorgeht.

Auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die hier geschilderten Grundlagen immer wieder aufgegriffen und verwendet, um besondere Aspekte analytisch aufzuklären.

##### 4.1.1 Extraktion mittels Mazeration

Die *Mazeration* diente als einfachste Art der Extraktion von EtG aus der Haarmatrix. Das Stehenlassen nach Mönch et al. [82] lieferte gute Ergebnisse mit hoher Wiederholbarkeit, vor allem, wenn es sich bei den extrahierten Proben um sog. gespikete Haarproben handelte. Die höhere Extraktionsausbeute bei der *Mikropulverisierung* führte jedoch zur Ablösung des Mazerationverfahrens. Wenn es dennoch Verwendung fand, (vgl. gespikete Haare oder SoHT Ringversuche), findet sich ein Vermerk im jeweiligen Kapitel.

##### 4.1.2 Extraktion mittels Mikropulverisierung

Alternativ zur Extraktion von EtG aus Haarmatrix durch *Mazeration* mit Reinwasser wurde ein Verfahren entwickelt, welches durch die Nutzung eines größeren Extraktionsvolumens v.A. bei größeren Probenmengen mit kleinen EtG-Gehalten die Wiederholbarkeit der Ergebnisse verbessert. Durch die Modifikation wurde je Probe eine Dreifachinjektion möglich, wo vorher nur zweifach injiziert werden konnte.

Als Vorteile der *Mikropulverisierung* gegenüber der *Mazeration* sind vor allem die sehr kurze Extraktionszeit von 30 Minuten gegenüber 48 Stunden und die bessere Nachweisbarkeit von EtG zu nennen. Durch die sog. *Mikropulverisierung* kann mehr EtG aus der Matrix extrahiert werden, als durch das bloße Stehenlassen im Lösungsmittel [83, 97]. Dies lässt sich gut durch das Aufbrechen der Haarstruktur während des Mahlvorganges erklären. Während beim Stehenlassen das Haar physikalisch nicht zerstört wird, sondern lediglich aufquillt, wird bei der *Mikropulverisierung* die Haarstruktur regelrecht aufgebrochen. Dies zeigen auch die REM-Aufnahmen von mikropulverisierten Haaren (Anhang, Kap. A-3). Es wird vermutet, dass durch das Mahlen tiefer in das Haar eingelagertes EtG besser extrahiert werden kann. Vergleiche dazu auch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von gemahlenem Haar in Anhang A-3.

Obwohl dieses Verfahren systematisch entwickelt und mit zahlreichen Messwerten hinterlegt wurde, stellte sich bei der praktischen Verwendung an größeren Probenserien heraus, dass die Menge an abnehmbaren Haarextrakt für eine Dreifachbestimmung unzureichend war. Da der Überstand der Probe mit einer 1 mL-Tuberkulinspritze mit Skalierung abgenommen wurde, ließ sich das Volumen der gewonnenen Überstandsmenge leicht bestimmen. In der Regel konnten bei Einsatz von 500 µL Extraktionsmittel etwa 200 µL Überstand gewonnen werden. Dies konnte während mehrerer Probenserien über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, wobei die tatsächliche Menge zwischen ca. 150 µL und 250 µL schwankte.

Zwar konnte das für eine Dreifachbestimmung gewonnene Volumen aus dem Extraktionsgefäß entnommen werden ( $3 \times 50 \mu\text{L} = 150 \mu\text{L}$ ), jedoch verblieb geometrisch bedingt immer eine kleine Menge der Probenlösung im Autosamplervial (Abbildung 10).

Diese Problematik wurde umgangen, indem das Extraktionsvolumen für die *Mikropulverisierung* in 100 µL-Schritten erhöht wurde. Dabei sollte das Volumen gefunden werden, bei dem mindestens 150 µL pipettierbares Volumen im Autosampler zur Verfügung standen. Eine Erhöhung des Extraktionsvolumens um nur 20 %, also 100 µL, erlaubte in jedem Fall eine Dreifachbestimmung der Probe.

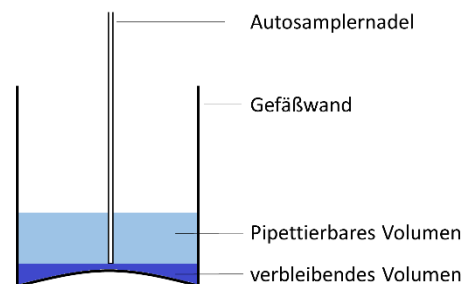


Abbildung 10: Verbleibendes Volumen im Autosampler-Vial: gewölbter Boden

In Kap 4.1.6 wird das verwendete HPLC-Verfahren inkl. Modifikationen genauer erklärt und auch das limit of detection (LOD) und das limit of quantification (LOQ) präsentiert. Durch eine Erhöhung des Extraktionsvolumens fand eine Verdünnung der Probe statt. Es muss folgerichtig davon ausgegangen werden, dass dieser Verdünnungseffekt auch Einfluss auf die Nachweis- und Bestimmungsgrenze hatte. Die Änderung wurde jedoch nicht als kritisch erachtet, da:

- Proben nahe des Quantifizierungslimits selten sind
- der von der SoHT festgelegte cut-off für Abstinenzler von 7 pg/mg deutlich höher liegt, als das Quantifizierungslimit
- durch die erfolgten Optimierungen am HPLC-MS/MS-Verfahren dieser Effekt größtenteils ausgeglichen werden sollte

Durch die Volumenoptimierung bei Beibehaltung aller weiteren Methodenparameter konnte bei allen durchgeführten Probenserien eine Dreifachinjektion durchgeführt werden. Dadurch erhöhte sich insbesondere bei niedrig konzentrierten Proben die Wiederholbarkeit und somit die Sicherheit bei der Bestimmung von EtG-haltigen Haarproben. Dem Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit generell der Vorzug gewährt und wurde standardmäßig verwendet. Abweichungen von diesem Verfahren, z.B. die Verwendung eines anderen Extraktionsverfahrens wie der Mazeration werden angegeben.

#### 4.1.3 Extraktion mittels Ultraschall im Ultraschallbad

Als Alternativverfahren zur Mikropulverisierung sollte ein Verfahren zur ultraschallgestützten Extraktion von EtG aus Haaren entwickelt werden. Hintergrund war die hohe Matrixbelastung der Haarextrakte durch die *Mikropulverisierung* und die schwierigere Aufarbeitung als bei der *Mazeration*. Die Ultraschallextraktion sollte also eine schnelle Probenaufarbeitung bei gleichzeitig minimaler Matrixbelastung ermöglichen.

Zum Test der Extraktionseffizienz wurde das Haarmaterial *HP-1* verwendet, welches einen Mittelwert nach *Mikropulverisierung* von  $13,8 \pm 1,2$  pg/mg ( $n = 3$ ) aufwies. Dieser Wert wurde als Referenzwert gesetzt. Alle Proben wurden eindeutig gekennzeichnet und in Abhängigkeit ihrer Extraktionsdauer immer in die gleichen Positionen eines Kunststoffprobenhalters ins Ultraschallbad eingehängt (Abbildung 11).



Abbildung 11: Position und Dauer der im Ultraschallbad extrahierten Proben (1 - 8 Stunden)

Der Abbildung 11 sind die Probenpositionen und die zugehörigen Extraktionszeiten zu entnehmen. Es wurde darauf geachtet, dass sich der Probenhalter immer an der gleichen Position, nämlich in der Mitte des Ultraschallbades befand.

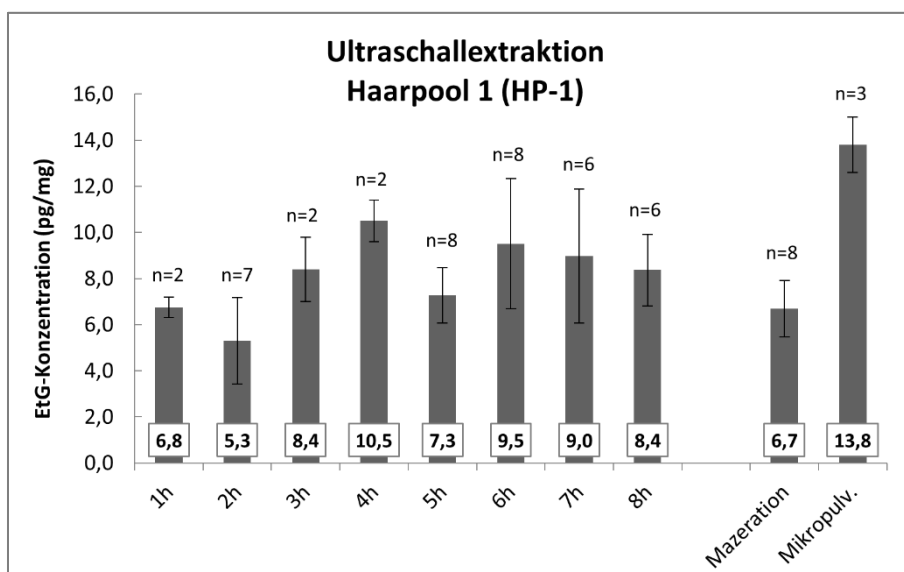


Abbildung 12: Ergebnisse nach Extraktion des Haarpools HP-1 im Ultraschallbad in Abhängigkeit der Extraktionszeit (HPLC-MS/MS); Mittelwerte, Standardabweichungen, Probenanzahl

Auf der rechten Seite der Abbildung 12 erkennt man unter *Mazeration* und *Mikropulverisierung* die Analysenergebnisse mit den beiden entsprechenden Extraktionsverfahren in Höhe von  $6,7 \pm 1,2$  pg/mg ( $n = 8$ ) im Falle der *Mazeration* und  $13,8 \pm 1,2$  ( $n = 3$ ) pg/mg im Falle der *Mikropulverisierung*. Vergleicht man diese beiden Werte, so fällt auf, dass mit Mikropulverisierung etwa die doppelte Extraktionsausbeute erreicht wurde. In keinem Fall der Extraktion im Ultraschallbad konnten Analysenwerte in dieser Höhe reproduziert werden. Jedoch war der Verlauf der Messwerte mit steigender Extraktionszeit bemerkenswert. Man würde ein stetiges Ansteigen der Messwerte erwarten. Dies ist aber nicht der Fall. Den höchsten Gehalt würde man somit nach acht Stunden erhalten, tatsächlich wurde der höchste Gehalt nach vier Stunden beobachtet ( $10,5 \pm 0,9$  pg/mg). Nach einer um eine Stunde verlängerten Extraktion lag der Mittelwert der Messwerte mit  $7,3 \pm 1,2$  pg/mg auf dem Niveau der Extraktion nach einer Stunde ( $6,8 \pm 0,5$  pg/mg). Der niedrigste Wert der gesamten Messserie wurde nach zwei Stunden erhalten ( $5,3 \pm 1,9$  pg/mg). Die wahrscheinlichste Erklärung dieses Phänomens ist die Bildung sog. Hotspots innerhalb des Ultraschallbades. Dabei handelt es sich um das Auftreten von Bereichen erhöhten Schalldruckes durch positive Überlagerung von Schallwellen. Es kann jedoch auch das Gegenteil eintreten: Frequenzlöschung durch Addition phasenverschobener Schallwellen. In diesen Bereichen des Bades kann weniger Energie in die Probengefäße eingetragen werden. Das Auftreten des beobachteten extrahierten EtG-Gehaltes mit fortlaufender Extraktionszeit kann gut mit diesem Sachverhalt erklärt werden. So standen die fünf Stunden extrahierten Haarproben offenbar an Stellen mit niedrigerem Schalldruck, während die Proben mit einer Extraktionszeit von vier Stunden an Stellen mit erhöhtem Schalldruck standen.

Der im Vergleich zur Mikropulverisierung geringere extrahierbare Gehalt an EtG lag wahrscheinlich in der zu kurzen Extraktionszeit begründet. Auch wird innerhalb eines Ultraschallbades eine große Menge der eingestrahnten Energie in Wärme umgesetzt. Das war auch gut an dem Temperaturanstieg des gesamten im Ultraschallbad befindlichen Wassers zu erkennen. Zu Beginn der Extraktion lag die Temperatur des Wassers bei Raumtemperatur. Nach nur einer Stunde stellte sie sich bei  $47^\circ\text{C}$  ein und blieb über den gesamten Extraktionszeitraum konstant.

Ebenso bestand die Möglichkeit, dass tief in der Haarmatrix eingebettetes EtG nicht per Ultraschall extrahierbar ist. Es wurden keine Versuche mit einer Dauer von mehr als acht Stunden durchgeführt, da diese aus praktischer Sicht uninteressant würden. Selbst eine Extraktionsdauer von acht Stunden dauert bereits 16 Mal länger als die Mikropulverisierung.

Der Ansatz, EtG mittels Ultraschall zu extrahieren und die Haarmatrix so nicht physikalisch aufzubrechen, wurde weiterhin verfolgt. Anstelle eines Ultraschallbades mit unbefriedigender Ultraschallübertragung wurde im nächsten Kapitel ein Gerät verwendet, welches innerhalb einer Sonotrode Ultraschall direkt und ohne den Einsatz von Wasser in die Probengefäße überträgt. Es stellt eine Weiterentwicklung zum Ultraschallbad dar.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten eindeutig die Möglichkeit, mittels Ultraschall EtG aus der Haarmatrix zu extrahieren. Jedoch zeigten sie auch, dass das Ultraschallbad keine geeignete Extraktionsmethode darstellt, da die Wiederholbarkeit sehr niedrig war. Es konnte nicht gewährleistet werden, dass alle Proben gleich schnell bzw. erschöpfend extrahiert wurden. Auf einen Positionswechsel wurde bewusst verzichtet, da die Extraktionen genügend oft wiederholt wurden, um einen sicheren Nachweis für das Auftreten dieses Effektes zu erbringen (1h, 3h, 4h:  $n=2$ ; 2h:  $n=7$ ; 5h, 6h:  $n=8$ ; 7h, 8h:  $n=6$ ).

#### **4.1.4 Extraktion mittels Ultraschall im Direktkontakt durch den VialTweeter®**

Die Zusammenfassung des vorangegangenen Kapitels wies bereits auf die Durchführung weiterer Versuche zur ultraschallgestützten Extraktion von EtG aus der Haarmatrix hin. Anstelle eines Ultraschallbades kam der VialTweeter der Fa. Hielscher Ultrasonics zum Einsatz. Die Besonderheit des Gerätes bestand in der Ultraschallübertragung ohne Verwendung eines wässrigen Mediums. Die Probengefäße, hier 2-mL-Eppendorfgefäße mit Schnappdeckel, wurden direkt in eine sog. Sonotrode eingesteckt. Nach Herstellerangaben sollte der Energieeintrag an jeder Position gleich sein, im



Gegensatz zum Ultraschallbad, bei dem eindeutig Unterschiede in der Extraktionsausbeute zwischen verschiedenen Positionen nachgewiesen werden konnten.

Ziel des Versuches war eine schnelle und gleichmäßige Probenextraktion, die eine möglichst vollständige EtG-Extraktion erlaubt. Der beste Fall wäre das Erreichen des Extraktionsniveaus der *Mikropulverisierung*. Der Versuch sah die Extraktion eines Haarmaterials bekannten EtG-Gehaltes und den Vergleich mit der Mikropulverisierung vor. Die Extraktion erfolgte unter drei unterschiedlichen Extraktionsbedingungen.

#### Extraktionsbedingungen

Der VialTweeter® hatte drei einstellbare Freiheitsgrade bezüglich der Extraktionsparameter:

- Extraktionszeit, gewählt: 30, 60 und 120 Minuten
- Amplitude: prozentualer Wert der maximalen Ausgangsleistung des Ultraschallgenerators, gewählt: 45, 70 und 100 %
- Pulsdauer: prozentualer Anteil der Einschaltdauer pro Sekunde, gewählt: 20 % (200 ms an, 800 ms aus), 40 % (400 ms an, 600 ms aus), 100 % (dauerhaft an)

Drei Extraktionsprogramme wurden anhand der oben beschriebenen Parameter zusammengestellt:

- *Programm 1:* Amplitude: 70 %, Pulsdauer 40 %
- *Programm 2:* Amplitude: 100 %, Pulsdauer: 20 %
- *Programm 3:* Amplitude: 45 %, Pulsdauer: 100 %

Durch diese Auswahl sollte untersucht werden, ob die Extraktionsausbeute neben der Extraktionszeit eher abhängig von der maximal eingestrahnten Energie ist, oder ob eine höhere Pulsdauer zu höheren Ergebnissen führte. Limitierender Faktor bei allen Kombinationen der beschriebenen Parameter war die Temperatur im Extraktionsgefäß. Durch den direkten Energieeintrag über die Sonotrode entwickelten sich innerhalb kurzer Zeit hohe Temperaturen in der Probe. Maximale Amplitude und Pulsdauer führten innerhalb von fünf Minuten zum Durchschmelzen der Eppendorfgefäße (maximale Verwendungstemperatur: 121 °C<sup>8</sup>). Oberhalb von 75 °C erfolgte eine Öffnung der Deckel durch entstehenden Überdruck. Als Maximaltemperatur wurden 65 °C gewählt. Dabei blieben alle Eppendorfgefäße intakt und die Deckel geschlossen.

#### Haarmaterial

Der *Haarpool HP-5-w* wurde zur Bestimmung der Extraktionseffizienz mittels VialTweeter eingesetzt. Es handelte sich um ein gepooltes Material mit einem EtG-Gehalt von 24,6 pg/mg, also noch unterhalb des Cut-offs von 30 pg/mg. Genauere Angaben zum Haarpool können Kap. 4.2.2 entnommen werden.

Die Gliederung des Versuches erfolgte in 12 Einzelversuche mit je fünf Wiederholextraktionen desselben Materials unter denselben Extraktionsbedingungen. Die restlichen fünf Probenpositionen wurden mit Wasser gefüllten Eppendorfgefäßen besetzt. Die Temperaturüberwachung erfolgte ständig in einem der ausschließlich mit Wasser befüllten Vials. Tabelle 14 beinhaltet eine Übersicht der durchgeführten Versuche.

---

<sup>8</sup> [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)

Tabelle 14: Analysenergebnisse für Haarpool-5 nach Extraktion mit Hielscher VialTweeter®

Haarmaterial	Versuch Nr.	Verwendetes Extraktionsprogramm	Dauer (min)
Haarpool Nr. 5 (gewaschen)	1	Programm 1	30
	4		60
	7		120
	2	Programm 2	30
	5		60
	8		120
	3	Programm 3	30
	6		60
	9		120

Die Beschallung von je fünf Proben mit den *Programmen 1* bis 3 führte nach 30 Minuten nicht zur gleichen Extraktionseffizienz, wie bei der Mikropulverisierung. Mit Analysenergebnissen zwischen 6,1 und 7,4 pg/mg konnten ca. nur 30 % der dort nachgewiesenen EtG-Menge extrahiert werden.

Es erfolgte eine Verdopplung der Extraktionszeit von 30 auf 60 Minuten. Ebenso stiegen die Analysenergebnisse der Fünffachbestimmungen bei den *Programmen 1* bis 3 um ca. 50 % an. Nun konnten zwischen 10,4 und 13,9 pg/mg EtG bestimmt werden.

In der Vermutung, eine weitere, annähernd lineare Skalierung der extrahierten EtG-Menge mit der Extraktionszeit zu erzielen, wurde diese von 60 auf 120 Minuten verlängert. Dies war jedoch nicht der Fall. Mit *Programm 1* konnte wiederum rund 50 % mehr EtG extrahiert werden, als nach 60 Minuten, jedoch blieb die extrahierte EtG-Menge bei den *Programmen 2* und 3 auf dem Niveau der Versuche mit 60 Minuten Extraktionsdauer (Abbildung 13).

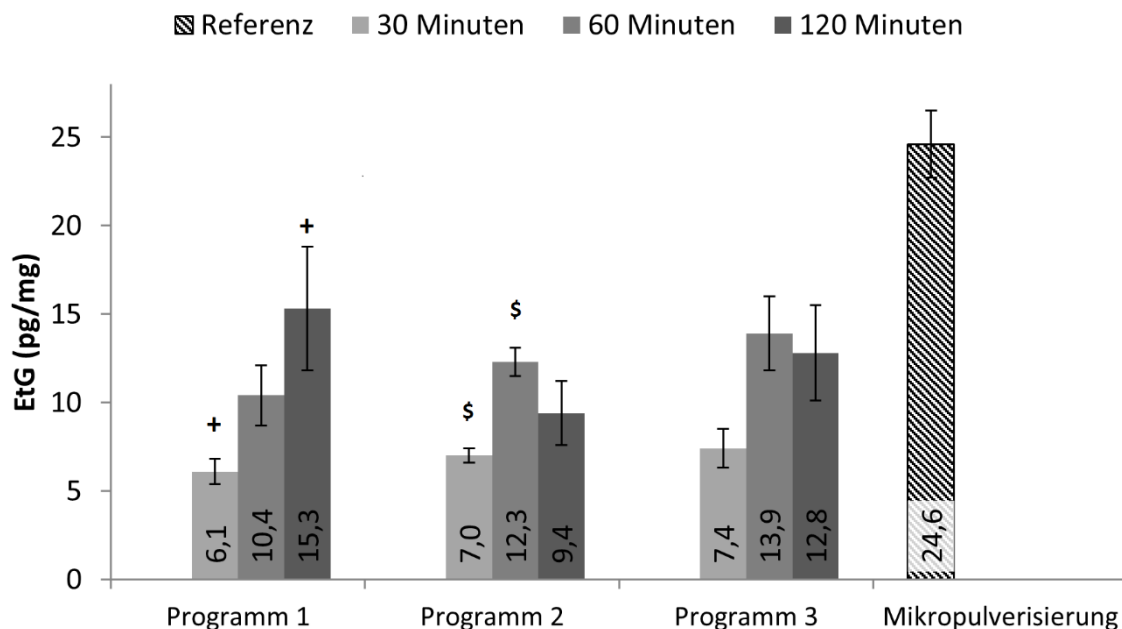


Abbildung 13: Zusammenfassung der Ergebnisse Ultraschallextraktionen von Haarpool HP-5-w n=5 außer bei Mikropulverisierung: n=9. <sup>+</sup>signifikanter Unterschied der Mittelwerte zwischen Programm 1 und Programm 2 bei 30 und 120 Minuten Extraktionszeit, Welch-Test, 95%-Konfidenzintervall (p = 0,033 und p = 0,021); <sup>§</sup>signifikanter Unterschied der Mittelwerte zwischen Programm 2 und Programm 3 bei 30 und 60 Minuten Extraktionszeit, Welch-Test, 95%-Konfidenzintervall (p = 0,047 und p = 0,021).

Die höchsten EtG-Ausbeuten konnten nach 120 Minuten Programm 1 und 120 Minuten Programm 3 erzielt werden, wobei beide Versuche sich statistisch nicht signifikant voneinander unterschieden ( $p > 0,05$ , einfaktorielle ANOVA, 95% Konfidenzintervall). Bei keinem Versuch wurde das Niveau der *Mikropulverisierung* erreicht (einfaktorielle ANOVA-Analyse, alle  $p$ -Werte  $< 10^{-4}$ , 95% Konfidenzintervall). Eine Tabelle mit allen errechneten  $p$ -Werten kann im Anhang A-4 eingesehen werden.

Aus dem Haarpool HP-5-w ließ sich EtG innerhalb von 120 Minuten nicht in zufriedenstellender Menge extrahieren. Das beste Ergebnis (*Programm 1*, 120 Minuten) wurde mit 38 % weniger Extraktionsausbeute als bei der *Mikropulverisierung* möglich, ermittelt.

Im Mikropulverisierungsverfahren konnten gleichzeitig 20 Proben extrahiert werden. Bei 20 Minuten Extraktionszeit entsprach das 40 Proben pro Stunde. Selbst mit 120-minütiger Extraktionsdauer beim VialTweeter®, welche noch zu niedrig gewählt war, wenn eine erschöpfende Extraktion auf diesem Wege überhaupt möglich ist, lag der Probendurchsatz bei maximal 5 Proben pro Stunde.

Beide Faktoren – lange Extraktionszeiten und ungenügende Extraktionseffizienz – ließen den VialTweeter® als schnelles Alternativverfahren zur *Mikropulverisierung* ausscheiden. Das Verfahren war nicht praktikabel genug, um einen geeigneten Ersatz darzustellen.

#### **4.1.5 Haarextraktreinigung mittels Festphasenextraktion (SPE)**

Ein großer Vorteil der LC-Triple-Quad-Kopplung im Vergleich zur einfachen LC-MS-Kopplung besteht in der großen Filterwirkung des ersten und letzten Quadrupols für störende Substanzen, welche das eigentliche Messsignal für den Analyten überlagern können. In der Regel sind selbst in wenig oder nicht gereinigten Matrices gute Signal-Rauschen-Verhältnis (S/N-Ratio) möglich. Die vorwiegend verwendete EtG-Analytik bediente sich dieser Analysetechnik. Die untersuchten Massenübergänge beruhen auf dem negativ ionisierten Mutterion des EtGs mit einem Masse-/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) von 221  $[M-H]^-$ . Bei den beobachteten Massenübergängen handelte es sich um die Fragmente mit  $m/z = 74,9$  und  $84,9$ . In Abbildung 14 ist ein repräsentatives Chromatogramm (ESM-2) abgebildet, bei dem EtG nach 3,0 Minuten eluiert. Das Signal entspricht einer EtG-Konzentration von 6,5 pg/mg. Wie vor allem bei der Massenspur 221  $\rightarrow$  84,5 zu erkennen ist, überlagerten starke Matrixeffekte das eigentliche EtG-Signal. Durch Matrixreduktion könnte sowohl ein verbessertes S/N-Verhältnis als auch ein höheres absolutes EtG-Signal erzielt werden, da Matrixeffekte wie Ionensuppression minimiert werden.

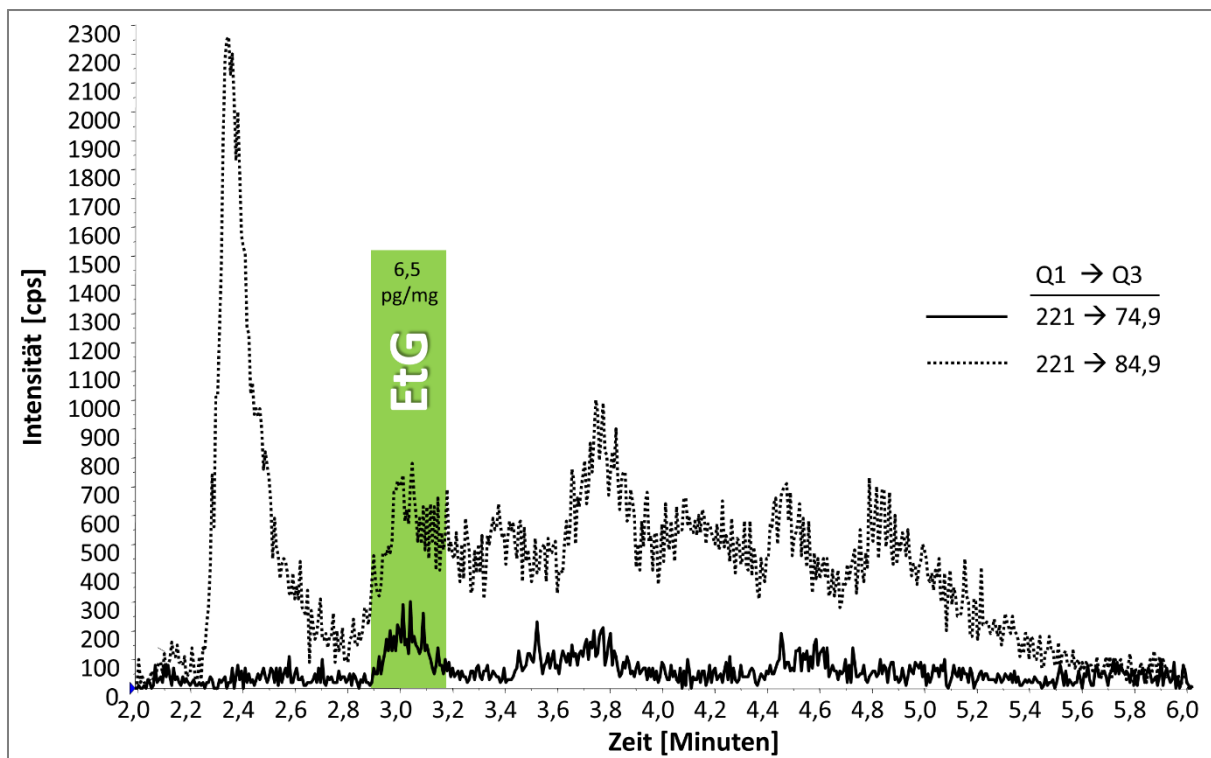


Abbildung 14: Repräsentatives Chromatogramm mit Störsignalen, Probe: ESM-2  
 $c(\text{EtG}) = 6,5 \text{ pg/mg}$ ; durchgezogene Linie: Q1: 221,0 → Q3: 74,9; gepunktete Linie: Q1: 221,0 → Q3: 84,9; Q1, Q3 = Quadrupol 1 und 3;  $R_t(\text{EtG}) = 3,05 \text{ min}$

Eine häufig angewandte Methode zur Reduktion von Matrixbestandteilen bzw. Konzentration des Analyten ist die sog. Festphasenextraktion (*solid phase extraction, SPE*). Dabei handelt es sich vom Prinzip her um eine kurze Säule, welche mit stationärer Phase gefüllt ist. Diese wird im Falle der SPE *Sorbens* genannt. Die SPE ist in folgende Phasen untergliedert:

### Equilibrieren

Benetzen des *sorbens* mit dem zur Beladung verwendeten Lösungsmittel

### Beladen

Aufgabe des Analyten-Matrixgemisches auf das vorbereitete *sorbens*

### Waschen

Möglichst spezifische Retention des Analyten und Elution von Begleitstoffen

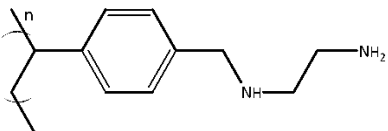
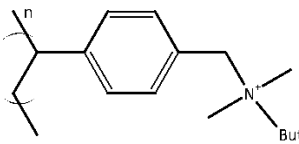
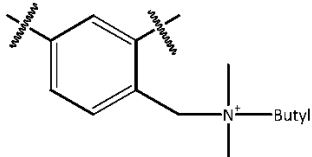
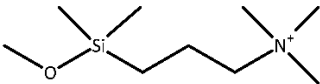

### Eluieren

Nach Waschen erfolgt die Elution des Analyten in möglichst reiner Form

Im Falle der GC-Analytik wird die SPE häufig eingesetzt, nicht zuletzt zur Realisierung eines Lösemittelwechsels von wässrig auf organisch [22, 31, 70]. Auch bei der HPLC-MS-Kopplung kommt SPE zum Einsatz [23, 37]. Ziel des Versuches war die Etablierung einer einfachen und schnell durchführbaren SPE-Methodik zur Reinigung von Haarextrakten von störenden Matrixbestandteilen. Dazu wurde eine Auswahl an SPE-Phasen (Sorbens) getestet und die Eignung zur selektiven Retention von EtG evaluiert. In Tabelle 15 dargestellt ist eine Übersicht aller getesteten Phasen.

Drei unterschiedliche Sorbentientypen (schwache und starke Anionentauscher sowie eine spezielle Graphitphase für EtG) von vier Herstellern wurden auf die Eignung zur Reinigung der gewonnenen Haarextrakte untersucht. Zur Bewertung der Phasen wurde jeweils das durchgelaufene Elutionsmittel der einzelnen Schritte im SPE-Protokoll aufgefangen, unter mildem Stickstoffstrom bei Raumtemperatur abgedampft und der Rückstand in 500 µL Wasser aufgenommen. Die so gewonnenen Lösungen wurden der LC-MS/MS-Analytik zugeführt. Zu jedem SPE-Protokoll wurde ein Balkendiagramm mit den Signalhöhen von EtG-*d*<sub>5</sub> jedes durchgeführten Schrittes angefertigt.

Tabelle 15: Sorbentien für die Festphasenextraktion von EtG

<i>Hersteller und Produktbezeichnung</i>	<i>Struktur</i>	<i>Eigenschaften</i>
Phenomenex Strata X-AW		Schwacher Anionentauscher
Phenomenex Strata X-A		Starker Anionentauscher
Waters Oasis MAX		Starker Anionentauscher
Agilent Bond Elute SAX		Starker Anionentauscher
UCT Clean Screen® EtG		Spezielle Graphitphase zur Retention von EtG

#### Phenomenex Strata X-AW

Die bindenden Domänen des schwachen Anionentauschers Strata X-AW verfügten über primäre und sekundäre Aminofunktionen, die laut Hersteller in neutralem Milieu einfach positiv geladen waren. Die Bindung des Analyten kam durch ionische Wechselwirkung des EtG-Anions mit dem positiv geladenen Sorbens zustande. Das Balkendiagramm in Abbildung 15 zeigt die EtG-*d*<sub>5</sub>-Verteilung innerhalb der Extraktionsschritte im SPE-Protokoll.

Das SPE-Protokoll war folgendermaßen aufgebaut:

- Beladen: 50 µL EtG/EtG- $d_5$ -Lösung (10,8 pg/mg und 99,3 pg/mg) in 1000 µL Ammoniumacetat 25mM
- Waschen: 1000 µL Ammoniumacetat 25 mM, danach 1000 µL Methanol
- Eluieren: 2 × 1000 µL Ameisensäure (5 Vol-% in Methanol)

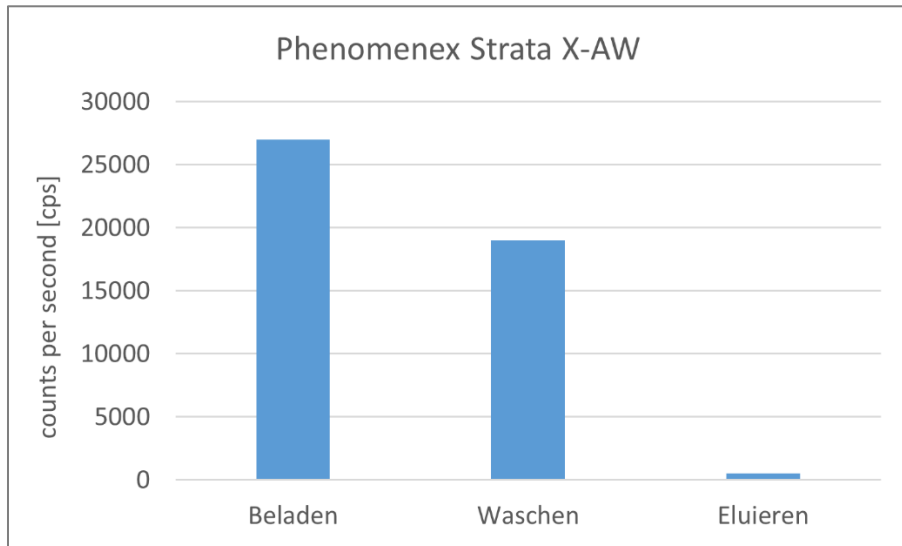


Abbildung 15: EtG- $d_5$ -Verteilung bei der SPE mit Phenomenex Strata X-AW

Klar erkennbar war der Durchbruch von EtG- $d_5$  bereits bei der Beladung. Ebenfalls beim Waschen wurden noch hohe Mengen EtG- $d_5$  detektiert. Bei der eigentlichen Elution war fast kein EtG- $d_5$  mehr nachweisbar. Die Phase zeigte keine Spezifität für EtG und war somit ungeeignet.

### Phenomenex Strata X-A

Die Wechselwirkung zum schwachen Anionentauscher Phenomenex Strata X-AW waren nicht ausreichend hoch, sodass ein Sorbens mit höherer Bindungskraft für EtG eingesetzt wurde. Anstatt des schwachen wurde nun ein starker Anionentauscher mit permanent positiv geladenem Stickstoffatom eingesetzt (siehe Tabelle 15).

Das SPE-Protokoll Nr.1 sah folgende Schritte vor:

- Beladen: 50 µL EtG/EtG- $d_5$ -Lösung (10,8 pg/mg und 99,3 pg/mg) in 1000 µL Ammoniumacetat 25mM
- Waschen: 3000 µL Ammoniumacetat 25 mM, danach 3000 µL Methanol
- Eluieren: 2 × 3000 µL Ameisensäure (5 Vol-% in Methanol)

In Abbildung 16 sind die erreichten Signalintensitäten der einzelnen SPE-Schritte dargestellt. Beim Beladungsschritt brach nun kein EtG bzw. EtG- $d_5$  mehr durch, jedoch konnte im Waschschrift mehr EtG- $d_5$  als im Elutionsschritt detektiert werden. Aus diesen Grunde wurde ein zweites SPE-Protokoll ausgearbeitet.

Das SPE-Protokoll Nr.2 sah folgende Schritte vor:

- Beladen: 50  $\mu\text{L}$  EtG/EtG- $d_5$ -Lösung (10,8 pg/mg und 99,3 pg/mg) in 1000  $\mu\text{L}$  Ammoniumacetat 25mM
- Waschen: 1000  $\mu\text{L}$  Ammoniumacetat 25 mM, danach 1000  $\mu\text{L}$  Methanol
- Eluieren: 2  $\times$  3000  $\mu\text{L}$  Ameisensäure (5 Vol-% in Methanol)

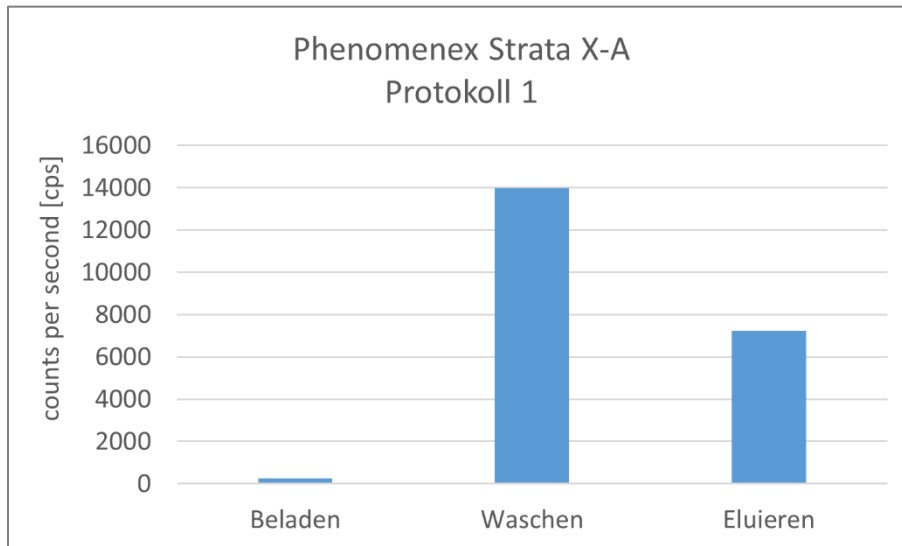


Abbildung 16: EtG- $d_5$ -Verteilung bei der SPE mit Phenomenex Strata X-A, Protokoll Nr.1

Die Reduktion des Waschvolumens von 2  $\times$  3000  $\mu\text{L}$  auf 2  $\times$  1000  $\mu\text{L}$  führte zu einer EtG-freien Waschfraktion. EtG war hauptsächlich in der Elutionsfraktion nachweisbar (Abbildung 17).

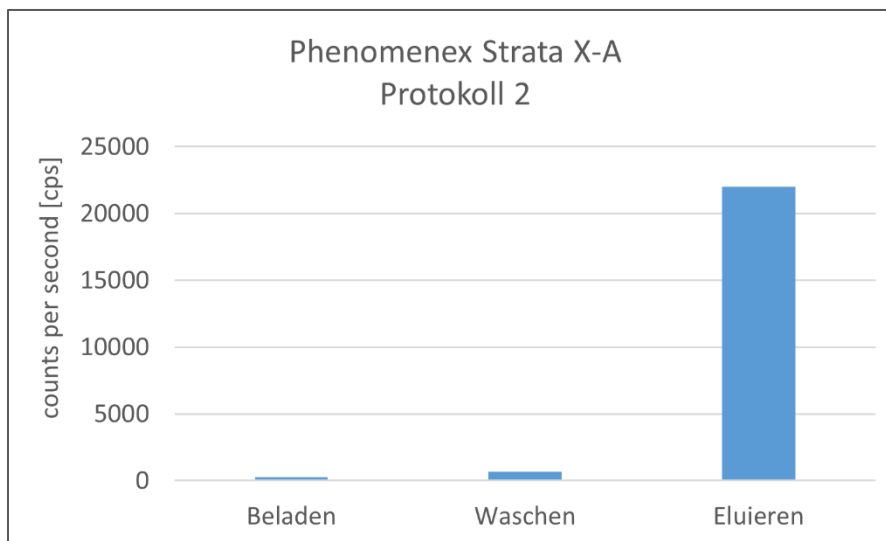


Abbildung 17: EtG- $d_5$ -Verteilung bei der SPE mit Phenomenex Strata X-A, Protokoll Nr.2

Obwohl eine gute Retention des EtGs erzielt werden konnte, musste das Sorbens als ungeeignet klassifiziert werden. Grund hierfür war eine nicht identifizierte Retentionszeitverschiebung um 0,5 Minuten zu späteren Zeiten, die sich auch nach mehreren Wiederholversuchen bestätigte. Eine mögliche Erklärung war die Koelution von Sorbensbestandteilen, die die Retentionszeit von EtG beeinflussten. Ebenso war der EtG-Gehalt nicht reproduzierbar bestimmbar (Daten nicht gezeigt).

### Waters Oasis MAX® und Agilent BondElute® SAX

Bei beiden Phasen handelte es sich um starke Anionentauscher. Bei allen gewählten Protokollen konnte die Durchbruchproblematik nicht verhindert werden. Da die Daten ähnlich denen der bereits getesteten Anionentauschern waren, werden sie hier nicht gezeigt.

### UCT Clean Screen® EtG 200 mg

Weder schwache noch starke Anionentauscher führten im Versuch zu zufriedenstellenden Ergebnissen, sei es durch mangelhaftes Retentionsverhalten oder durch Retentionszeitverschiebung. Als Konsequenz wurde ein für die Retention von EtG entwickeltes Sorbens getestet - UCT Clean Screen® EtG SPE-Kartuschen. Das Sorbens bestand aus graphitiertem Kohlenstoff und wies damit Ähnlichkeit zum Säulenmaterial der zur HPLC-Analytik verwendeten Hypercarbsäule auf. Die Wechselwirkung von EtG mit dem Sorbens beruht neben der Adsorption an die Oberfläche auf elektronischen Effekten, die durch die polaren Eigenschaften des Moleküls induziert werden.

- Beladen: 50 µL EtG/EtG-*d*<sub>5</sub>-Lösung (10,8 pg/mg und 99,3 pg/mg) in 1000 µL Reinwasser
- Waschen: 3000 µL Reinwasser
- Eluieren: 2 × 3000 µL Ameisensäure (1 Vol-% in Methanol)

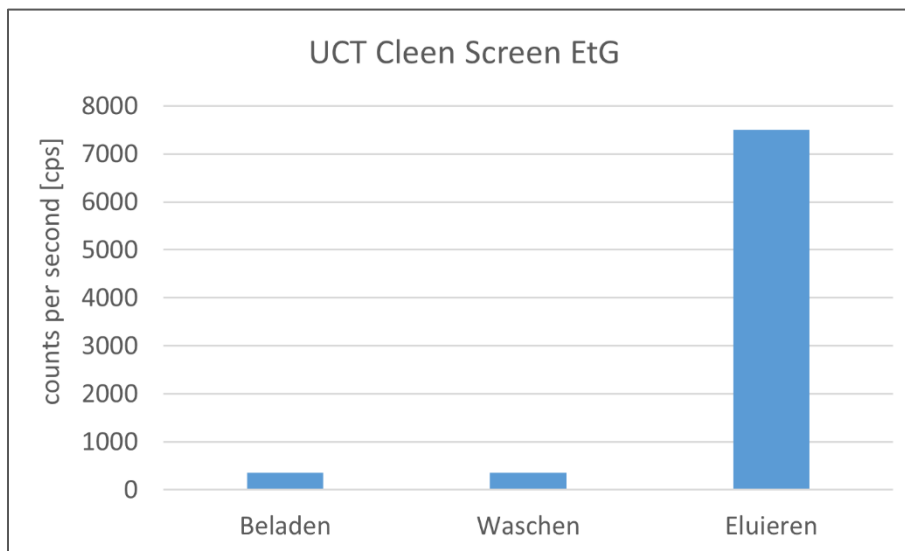


Abbildung 18: EtG-*d*<sub>5</sub>-Verteilung bei der SPE mit UCT Clean Screen®

Nach Beladen und Waschen lag die Signalintensität für EtG-*d*<sub>5</sub> in Höhe des Grundrauschens bei ca. 350 *counts per second* (Abbildung 18), ohne erkennbaren Peak im Chromatogramm. Nach Elution lag die Signalintensität bei 7500 cps. Die Daten belegten eine erfolgreiche Retention des EtGs auf dem Sorbens.

Zusätzlich wurde eine EtG-Lösung mit 45,5 pg/mg EtG und 99,3 pg/mg EtG-*d*<sub>5</sub> über die gleichen Kartuschen gereinigt. Nach je zwei Wiederholungen erfolgte die Analyse der Elutionsfraktionen mittels HPLC-MS/MS. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.



Tabelle 16: Messergebnisse des EtG-Standards mit 10,8 pg/mg nach SPE mit UCT Clean Screen® EtG

<i>Messwerte (pg/mg)</i>	<i>Mittelwert (pg/mg)</i>	<i>SD (pg/mg)</i>	<i>RSD (%)</i>
11,0 11,2 11,7	11,3	0,3	2,8
9,5 7,7 9,3	8,8	1,0	11,3

Über beide Messungen gemittelt wurde eine Wiederfindung von 93,5 % erreicht.

Tabelle 17: Messergebnisse des EtG-Standards mit 45,5 pg/mg nach SPE mit UCT Clean Screen® EtG

<i>Messwerte (pg/mg)</i>	<i>Mittelwert (pg/mg)</i>	<i>SD (pg/mg)</i>	<i>RSD (%)</i>
73,9 76,2 78,5	76,2	2,3	3,0
76,3 76,7 76,1	76,4	0,3	0,4

Im Falle des höheren EtG-Standards betrug die Wiederfindung 167,7 %. Mit einer konstanten Wiederfindung über einen größeren Konzentrationsbereich wäre es durchaus möglich gewesen, EtG sicher zu quantifizieren, selbst wenn diese nicht bei 100 % gelegen hätte. Eine nicht reproduzierbare Wiederfindung des Analyten macht das Verfahren jedoch unbrauchbar. Eine einfache Lösemittelkalibrierung in Reinwasser hätte einer Kalibrierung nach SPE-Extraktion weichen müssen, um die Wiederfindungsrate zu kompensieren. Jedoch wäre auch hierbei eine Wiederfindungsstudie jedes einzelnen Kalibrierstandards und ein Vergleich mit EtG-haltigem Haarmaterial ähnlichen Gehaltes nötig gewesen, um zu bestätigen, dass die Wiederfindungsraten gleich sind. Der Aufwand erschien gemessen an dem höchst unsicheren Ergebnis, als nicht gerechtfertigt. Eine mögliche Erklärung für die zu hoch bestimmten EtG-Gehalte der Standards könnte die eigentliche Eignung der Phase für EtG in Urin sein. Die in dieser Matrix herrschenden Bedingungen unterscheiden sich z.T. stark von denen im Haar: Protein und Fettsäurefreiheit, Partikelfreiheit, völlig differierende Salzzusammensetzung, anderer Konzentrationsbereich.

#### Fazit

- Optimierung von SPE-Protokollen für die sichere Bestimmung von EtG in Haaren sind nicht trivial
- Anionentauscher sind nur bedingt geeignet
- Selbst Sorbentien speziell für die EtG-Retention verhalten sich beim Einsatz von Haarextrakten nicht bei allen getesteten Konzentrationen vorhersehbar
- Hoher Kalibrierbereich muss abgedeckt werden (ca. 1,0 bis 800,0 pg/mg) → großer Validierungsaufwand

#### 4.1.6 EtG-Analytik mittels HPLC-MS/MS – ein qualitätsgesichertes Analysenverfahren

Die Hochdruckflüssigkeitschromatografie gekoppelt mit der Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) vereint schnelle Analysezeiten, niedrige Nachweisgrenzen und selektive Quantifizierung von EtG und Strukturverwandten im Spurenbereich, selbst bei Vorhandensein von Probenmatrix. Beim vorgestellten Verfahren handelt es sich um eine modifizierte Variante von Mönch et al. [97]. Der generelle Ablauf der Analyse, ergänzend zu Kap. 3.3.4 ist nachfolgend aufgelistet:

- Extraktion von Haarproben
- Injektion der wässrigen Extrakte im Autosampler
- Isokratische Trennung der Probenbestandteile im Wasser/Acetonitril/Ameisensäuregemisch auf einer Thermo Fisher Hypercarb®-Säule
- Negative Ionisierung in der ESI-Quelle
- Selektierung der Mutterionen (Quadrupol 1)
- Fragmentierung in der Kollisionszelle (Quadrupol 2)
- Selektierung der Fragment-Ionen (Quadrupol 3)
- Detektion

Die Methodik ermöglicht die Abtrennung des EtGs von wasserlöslichen Haarmatrixbestandteilen und somit die Detektion des Analyten. Auch wenn die HPLC-MS/MS-Kopplung ein effektives Werkzeug zur Trennung und Detektion von Analytmolekülen darstellt, traten vor allem bei Vorhandensein von Haarmatrix Störsignale auf, welche in der Regel zu einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses führten. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, erfolgte eine Neuoptimierung des Verfahrens, insbesondere der Ionenquellen- und MS-Parameter. Eine Gegenüberstellung der alten und neu-optimierten Parameter sind in Tabelle 18 zusammengestellt.

Tabelle 18: Optimierte Parameter der EtG-Analytik: Ionenquelle und Massenspektrometer  
Grau: nicht optimierte, frühere Parameter; fett gedruckte Werte: Quantifier-Fragmente

<u>Ionenquelle</u>							
<i>CUR (a.u.)</i>	<i>CAD (a.u.)</i>	<i>IS (V)</i>	<i>TEM (°C)</i>	<i>GS1 (a.u.)</i>	<i>GS2 (a.u.)</i>	<i>ihe</i>	
25*	12	-4000*	500	80*	90*	an	
40		-4500		90	80		
<u>Massenspektrometer</u>							
<i>Analyt</i>	<i>Q1 m/z</i>	<i>Q3 m/z</i>	<i>Dwell time (ms)</i>	<i>Q2 (Kollisionszelle)</i>		<i>CE</i>	<i>CXP</i>
EtG	220,848	<b>74,938</b>	100	-28	-9	-27	-7
		84,944		-28	-10	-26	-7
	221,071	<b>74,9</b>	100	-46	-6	-24	-6
		84,9		-48	-4	-25	-6
EtG-d <sub>5</sub>	225,999	<b>74,922</b>	100	-27	-9	-26	-7
		84,906		-27	-10	-26	-7
	225,979	<b>74,9</b>	100	-54	-5	-23	-6
		85,0		-49	-7	-24	-6

Das Rauschen des Massenspektrometers (Übergang  $m/z = 221,071 \rightarrow 74,9$ ) konnte um etwa den Faktor zwei reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Es erfolgte keine Neuvalidierung des Verfahrens, sodass die bestehenden Parameter, insbesondere für LOD und LOQ übernommen werden konnten (und wahrscheinlich zu einer Verbesserung führten):

- LOD 0,46 pg/mg
- LOQ 2,29 pg/mg
- Präzision 5,04 %
- Intermediärpräzision 5,43 %

Die Detektion von EtG erfolgte also unter Verwendung eines validen Verfahrens. Zur Qualitätssicherung wurden mehrere Maßnahmen durchgeführt:

- Kalibrierung: mindestens sechs äquidistante Kalibrierpunkte
- Akzeptanzkriterium Korrelationskoeffizient Kalibriergerade:  $R^2 \geq 0,99$
- Mitführen von sog. Quality Controls (QCs) – Injektion zweier unterschiedlicher EtG-Niveaus innerhalb der Messserien zur Abschätzung von Trendverhalten
- Waschzyklen innerhalb langer Sequenzen: Alle 20 Injektionen: geringes Volumen an Methanol gefolgt von zwei Injektionen Reinwasser
- Überwachung der Retentionszeiten: Bei Verschiebung → Austausch der Vorsäule bzw. der analytischen Säule

Mithilfe des vorgestellten Verfahrens konnten die in den folgenden Experimenten erhaltenen Ergebnisse mit großer Sicherheit bestimmt werden. Ebenso war die Methodik wichtigstes Werkzeug für die Vorbereitung und Erstellung von homogenen Haar-Referenzmaterialien mit definiertem EtG-Gehalt.

## 4.2 Qualitätssicherung bei der EtG-Bestimmung in Haaren: Restgehalt von EtG im internen Standard EtG- $d_5$ und Herstellung von Haar-Referenzmaterialien

Zuverlässige Ergebnisse bei der Untersuchung von hergestellten Haar-Referenzmaterialien sind die Grundlage zur Beurteilung der erhaltenen Materialien. Mit Hilfe des in Kap. 4.1.6 vorgestellten Verfahrens war dies zweifellos möglich. Ebenso wichtig ist die Kenntnis der Reinheit des verwendeten internen Standards, in diesem Falle EtG- $d_5$ . Während leichte Verunreinigungen meist keine große Rolle bei der Quantifizierung der Ergebnisse spielen, kann der Anteil von nicht-deutertem EtG im internen Standard an Einfluss gewinnen.

In diesem Abschnitt wird die Reinheit des internen Standards EtG- $d_5$  erläutert sowie die Homogenität von selbst hergestellten Referenzmaterialien und solchen aus externen Quellen beurteilt. Weiterhin werden die Ergebnisse dreier SoHT-Ringversuche beurteilt und die Langzeitstabilität des Analyten EtG bei beschleunigter Alterung untersucht.

### 4.2.1 Restgehalt von EtG im internen Standard EtG- $d_5$

Üblicherweise wird EtG- $d_5$  als interner Standard für die Quantifizierung von EtG bei der Analytik mittels HPLC-MS/MS, aber auch bei anderen massenspektrometrischen Messungen verwendet. Der Vorteil gegenüber anderen Substanzen ist seine strukturelle Gleichartigkeit mit EtG. Einzig die Wasserstoffatome an der Ethoxygruppe am anomeren Kohlenstoffatom wurden gegen Deuteronen ausgetauscht. Dadurch besitzt EtG- $d_5$  die gleichen strukturellen sowie chemischen Eigenschaften von EtG, jedoch lässt sich über einen Massenunterschied von fünf atomaren Masseneinheiten eine sichere Detektion neben EtG gewährleisten. Misst man höhere EtG- $d_5$  Konzentrationen jenseits von etwa 250 pg/mg ohne das Vorhandensein von EtG (z.B. bei Kalibratoren), so fällt neben dem EtG- $d_5$ -Signal ein sehr kleines EtG-Signal auf. Dabei handelt es sich um eine Syntheseverunreinigung, da vollständig deuteriertes Ethanol, welches zur Synthese verwendet wird, nicht verfügbar ist. Der verwendete Standard stammte von Medichem-Diagnostica, Steinenbronn.

Um der Frage auf den Grund zu gehen, um welche Mengen an EtG es sich handelt, wurde eine EtG- $d_5$ -Lösung hergestellt und analysiert. Als interner Standard fand die Substanz Phenylglucuronid (PhG) Verwendung. Vom Prinzip war jede stabile Substanz, die unter den gegebenen Bedingungen vollständige Löslichkeit zeigte und im chromatografischen System eluierte, geeignet, jedoch wurde besonderes Augenmerk auf strukturelle Ähnlichkeit gelegt. Ebenso sollte die Substanz in einem angemessenen Elutionszeitfenster zu EtG eluieren. PhG erfüllte diese Bedingungen. In Abbildung 19 sind die Strukturen der verwendeten Substanzen EtG, EtG- $d_5$  und PhG dargestellt.

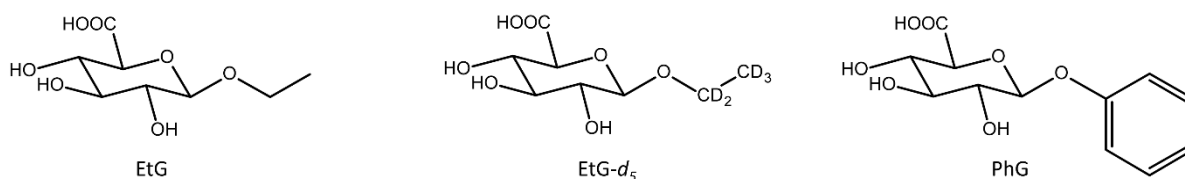


Abbildung 19: Strukturen von  $\beta$ -D-Ethylglucuronid,  $\beta$ -D-Ethylglucuronid- $d_5$  und  $\beta$ -D-Phenylglucuronid

Als Kalibrierstandards wurden die routinemäßig verwendeten EtG-Standards eingewogen.

### Analytische Beurteilung des internen Standards EtG- $d_5$

Die Analyse der Verdünnung Nr.2 = 10147 pg/mg erfolgte gegen eine EtG- Kalibrierung im Bereich von 5,6 bis 106,6 pg/mg. Anhand von Schätzungen aus früheren Beobachtungen wurden ca. 0,5 % EtG im EtG- $d_5$  erwartet, was etwa einer Konzentration von ca.  $10146,6 \cdot 0,005 = 50$  pg/mg entspräche. Die erhaltene Kalibriergerade ist in Abbildung 20 dargestellt.

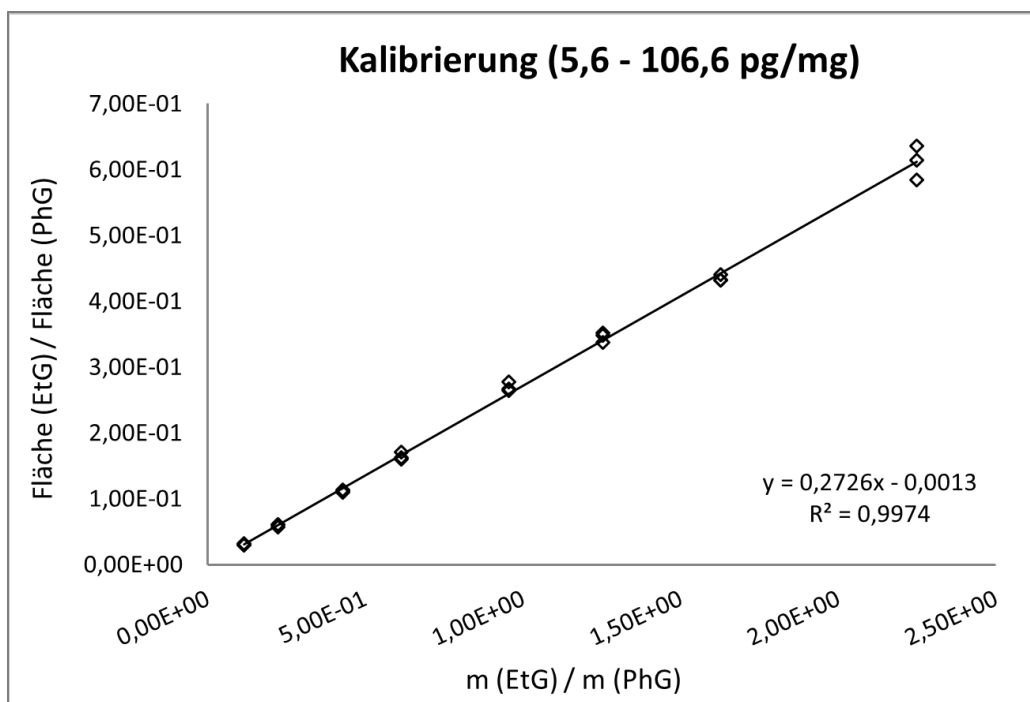


Abbildung 20: Kalibriergerade EtG-Standards zwischen 5,6 und 106,6 pg/mg zur Analyse des Restgehaltes von EtG in EtG-*d*<sub>5</sub>

Basierend auf dieser Kalibrierung ( $y = 0,2726x - 0,0013$ ,  $R^2 = 0,9974$ ) wurde die in Kapitel 3.3.2 beschriebene EtG-*d*<sub>5</sub>-Untersuchungslösung ausgewertet. Dazu wurden vier Aliquote der Lösung wie beschrieben behandelt und analysiert.

Tabelle 19 zeigt jeweils die Ergebnisse der 3-fach-Injektionen der EtG-*d*<sub>5</sub>-Untersuchungslösung, die arithmetischen Mittel der 3-fach-Injektionen mit Standardabweichung (SD) und relativer Standardabweichung (RSD) und das arithmetische Mittel aller Messungen inklusive SD und RSD.

Tabelle 19: Analysenergebnisse der EtG-*d*<sub>5</sub>-Untersuchungslösung auf Restgehalt von EtG

<i>EtG-d<sub>5</sub>-Aliquot</i>	<i>Injektion #</i>	<i>Gehalt EtG (pg/mg)</i>	<i>Mittelwert nach Dreifachinjektion (pg/mg)</i>	<i>SD (pg/mg)</i>	<i>RSD (%)</i>
A	1	29,1	28,3	0,7	2,6
	2	27,6			
	3	28,2			
B	1	28,1	28,1	0,2	0,6
	2	28,3			
	3	28,0			
C	1	28,6	28,0	0,5	1,9
	2	27,8			
	3	27,6			
D	1	29,1	28,2	1,1	4,0
	2	28,6			
	3	26,9			
<b>Mittelwert Proben A, B, C und D</b>			<b>28,2</b>	<b>0,6</b>	<b>2,3</b>

Der noch enthaltene EtG-Gehalt der Probe konnte mit  $28,2 \pm 0,6$  pg/mg EtG bestimmt werden. Relative Schwankung der Ergebnisse betrug 2,3 %. Damit ist das Ergebnis der Analyse hinreichend genau beschrieben.

Um den prozentualen Anteil von EtG in EtG- $d_5$  zu bestimmen, musste das errechnete Ergebnis mit der Konzentration an EtG- $d_5$  in ebendieser Probe ins Verhältnis gesetzt werden.

#### Berechnung des EtG-Gehaltes in der EtG- $d_5$ -Probe

Berechnete Konzentration EtG- $d_5$ der Untersuchungslösung	10147 pg/mg
Gemessene Konzentration an EtG in der Untersuchungslösung	28,2 pg/mg

---

Anteil EtG an EtG- $d_5$	<b>0,28 %</b>
--------------------------	---------------

Es waren **0,28 %** natives EtG im EtG- $d_5$ -Standard vorhanden. Eine Korrektur bei der Auswertung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben wurde nicht vorgenommen, da der Anteil sehr klein war. Die Konzentration des internen Standards lag üblicherweise bei ca. 100 pg/mg EtG- $d_5$ . Davon sind rechnerisch 0,282 pg natives EtG. Unter den verwendeten Bedingungen war diese Konzentration nicht detektierbar, da sie etwa 50 % unter dem Detektionslimit liegt und durch Ionensuppression bei Realproben kleinste Mengen EtG nicht entdeckt werden können.

Mögliche Szenarien, weshalb das im internen Standard bereits enthaltene EtG störend wirken könnte:

- Einsatz von höheren Konzentrationen an EtG- $d_5$  in Proben, z.B. bei Urinanalytik
- Einsatz von höheren Konzentrationen an EtG- $d_5$  bei gleichzeitig sehr niedrig konzentrierten Haarproben
- Verwendung einer anderen Charge EtG- $d_5$  mit eventuell höherem EtG-Gehalt
- Wahl eines anderen Herstellers des Internen Standards

#### 4.2.2 Herstellung und Charakterisierung von Haar-Referenzmaterialien

In diesem Kapitel wird die Herstellung von Haar-Referenzmaterialien beschrieben. Dabei handelte es sich um selbst hergestellte und homogenisierte Materialien von einzelnen Haarspendern, selbst hergestellte und homogenisierte Haarpoools, also um Mischungen von Materialien von mehreren Haarspendern und Haar-Referenzmaterialien der Firma Medichem Diagnostica GmbH, welche auch in den später diskutierten *EtG-Ringversuchen der SoHT* Verwendung fanden. In enger Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner Medichem Diagnostica GmbH richtete die SoHT Ringversuche zur Bestimmung von EtG in Haarmaterialien aus. Lieferant der Materialien war Medichem Diagnostica. Ihren Angaben zufolge wurden einige in dieser Arbeit untersuchten Materialien auch in den Ringversuchen ausgegeben und deren Gehalt somit von einer großen Zahl teilnehmender Laboratorien bestätigt (Kap. 4.2.3).

##### Haar-Referenzmaterialien aus eigener Herstellung

Die Herstellung der hier diskutierten Materialien erfolgte nach Maßgaben der in Kap. 3.2.3 beschriebenen Verfahren. Der wesentliche Unterschied zwischen den Materialien mit den Bezeichnungen *Einzelspendermaterial* (ESM) und *Haarpool* (HP) besteht in der Zusammensetzung der Materialien: Einzelspendermaterialien bestehen nur aus zerkleinerten, homogenisierten Haaren einer einzelnen männlichen Person, Haarpoools werden durch Verschneiden mehrerer ESMs hergestellt. In Tabelle 20 ist eine Übersicht mit allen während dieser Arbeit angefertigten bzw. überprüften ESMs und HPs dargestellt.

Tabelle 20: Hergestellte Einzelhaarmaterialien und Haarpools

<i>Haarmaterial</i>	<i>Probenanzahl (n)</i>	<i>Mittelwert (pg/mg)</i>	<i>SD (pg/mg)</i>	<i>RSD (%)</i>
ESM-1 <sup>3</sup>	4	82,9	12,3	14,8
ESM-2	3	6,5	0,9	14,4
ESM-3 <sup>c</sup>	13	4,2	1,1	25,6
ESM-4 <sup>c, e</sup>	5	520,4	69,4	13,3
ESM-5 <sup>c</sup>	11	640,8	76,6	12,0
ESM-6 <sup>c, e</sup>	2	<b>1,6</b>	0,4	26,5
ESM-7	2	5,2	0,2	4,1
ESM-8	22	70,1	15,1	21,5
ESM-9	2	16,8	0,5	3,0
ESM-10 <sup>e</sup>	5	22,5	1,8	8,2
ESM-11	3	<b>1,4</b>	0,6	39,8
ESM-12	3	4,6	0,3	6,2
ESM-13	5	9,9	0,7	7,1
HP-1 <sup>*a</sup>	3	13,8	1,2	9,0
HP-2 <sup>*</sup>	6	22,1	1,9	8,6
HP-3 <sup>*c, d, f</sup>	11	22,3	0,9	4,2
HP-4	10	21,1	1,4	6,9
HP-4-w	9	19,4	0,6	3,1
HP-5	10	23,9	1,8	7,6
HP-5-w <sup>b</sup>	9	24,6	1,9	7,7

\* Materialien bereits vorhanden: nur erneute Analytik durchgeführt  
 fett gedruckte Werte < LOQ; Verwendung der Materialien: <sup>a</sup> Ultraschallextraktion (Kap. 4.1.3), <sup>b</sup> VialTweeter-Extraktion (Kap. 4.1.4), <sup>c</sup> Bleichen von Haaren (Kap. 4.3.3), <sup>d</sup> Testung von HPLC-Phasen (Anhang A-1), <sup>e</sup> Antikörper-basiertes Schnelltestverfahren (Kap. 4.3), <sup>f</sup> REM-Aufnahmen von Haaren (Anhang A-3)

Die SoHT empfiehlt in ihrem *Consensus on Alcohol Markers* die Verwendung des proximalen, also kopfhautnahen Abschnittes von Null bis sechs Zentimetern ([www.soht.org](http://www.soht.org)). Diese Empfehlung ist vernachlässigbar, wenn nur die Homogenität der EtG-Verteilung in einem Material betrachtet wird und keine Beurteilung des vorangegangenen Trinkverhaltens erfolgen soll. Durch das über-kopf-Schütteln gelang es, homogene Gesamtheiten mit gleichmäßigem EtG-Gehalt herzustellen. Die Messwerte zu den Materialien schwankten zwischen 1,8 und 39,8 % um den Mittelwert (Tabelle 20). Bei niedrigen EtG-Gehalten nahe der Bestimmungsgrenze streuten die Einzelmesswerte stärker als bei höheren Gehalten. Auffällig waren auch die beiden vorgewaschenen Haarpools HP-4-w und HP-5-w, bei denen die relativen Standardabweichungen der Mittelwerte mit 7,7 und 3,1 pg/mg besonders niedrig ausfielen.

#### Haar-Referenzmaterialien der Medichem Diagnostica GmbH

Wie einleitend beschrieben, wurden mehrere Materialien, welche vom Kooperationspartner Medichem Diagnostica GmbH stammten, auf ihre Homogenität überprüft. Es handelte sich um sechs *authentische* Materialien und 12 sogenannte *dotierte* Materialien, bei denen durch ein spezielles Verfahren eine genau definierte EtG-Menge homogen auf das Haarmaterial aufgetragen wurde. Ziel bei beiden Arten von Materialien war es, eine möglichst homogene Einheit herzustellen, bei der jeder Aliquot den gleichen Gehalt an EtG aufweist. Die Haare wurden bei Medichem Diagnostica bereits auf eine Länge von 1,0 mm geschnitten und homogenisiert. Das Schneiden der Haare erhöhte die Handhabbarkeit der Proben und ist bei der Herstellung von Haarpools definierten Gehaltes unabdingbar. Während das Haar eines Einzelspenders in sich keinen homogenen EtG-Gehalt aufweisen

kann, sei es nun durch unregelmäßige Aufnahme von Alkohol oder durch biochemische oder essensgewohnheitsmäßige Einflüsse, kann ein annähernd homogenes Material durch Durchmischung genügend kleiner Haarpartikel homogenisiert werden. Ebenso ist es möglich, Haarpools durch das Verschneiden kleiner Partikel unterschiedlicher Herkunft herzustellen. Das Mischen dieser Einzelhaare ist umso leichter, je kürzer die hergestellten Teilchen sind.

Sofern keine eigens hergestellten Referenzmaterialien verfügbar sind, ist das Vorhandensein von eingestellten Referenzmaterialien wichtig für:

- die Entwicklung von Nachweismethoden
- den Vergleich von Extraktionsausbeuten verschiedener Verfahren
- Validierungsexperimente
- Ringversuche



Tabelle 21: Haar-Referenzmaterialien der Medichem Diagnostica GmbH

<i>Haarmaterial</i>	<i>Extraktionsmethode</i>	<i>Analysen- methode</i>	<i>Probenanzahl (n)</i>	<i>dotierte Konzentration (pg/mg)</i>	<i>MW (pg/mg)</i>	<i>SD (pg/mg)</i>	<i>RSD (%)</i>
Medichem-1 <sup>a</sup>	Mazeration	GC-NCI-MS*	26	-	70,6	2,1	3,0
Medichem-2	Mazeration	GC-NCI-MS*	26	-	42,2	4,5	10,6
Medichem-3	Mazeration	GC-NCI-MS*	20	-	48,5	2,8	5,8
Medichem-4	Mikropulverisierung	HPLC-MS/MS	10	-	6,5	1,1	17,0
Medichem-5	Mikropulverisierung	HPLC-MS/MS	20	-	21,5	2,3	10,8
Medichem-6 <sup>a</sup>	Mikropulverisierung	HPLC-MS/MS	20	-	25,1	3,4	13,7
Medichem(Dot)-1	Mazeration	HPLC-MS/MS	10	0	< LOD	-	-
Medichem(Dot)-2	Mazeration	HPLC-MS/MS	9	2	<b>2,1</b>	0,9	44,6
Medichem(Dot)-3	Mazeration	HPLC-MS/MS	10	5	4,3	0,4	8,2
Medichem(Dot)-4	Mazeration	HPLC-MS/MS	10	7	7,1	1,0	14,3
Medichem(Dot)-5	Mazeration	HPLC-MS/MS	9	10	11,5	3,2	27,7
Medichem(Dot)-6	Mazeration	HPLC-MS/MS	9	20	21,4	1,6	7,6
Medichem(Dot)-7	Mazeration	HPLC-MS/MS	9	25	26,4	1,1	4,3
Medichem(Dot)-8	Mazeration	HPLC-MS/MS	10	30	31,6	1,1	3,6
Medichem(Dot)-9	Mazeration	HPLC-MS/MS	9	35	38,4	1,2	3,0
Medichem(Dot)-10	Mazeration	HPLC-MS/MS	10	50	53,1	2,6	4,9
Medichem(Dot)-11	Mazeration	HPLC-MS/MS	10	100	107,7	3,9	3,6
Medichem(Dot)-12	Mazeration	HPLC-MS/MS	10	200	201,1	5,4	2,7

Authentische Materialien: Medichem-1 bis Medichem-6; Dotierte Materialien: Medichem(Dot)-1 bis Medichem(Dot)-12

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, RSD: Relative Standardabweichung, fett gedruckte Werte < LOQ

\*GC-MS-Verfahren: Mönch et al. [82], <sup>a</sup> Verwendung in Kap. 4.2.4 Stabilitätsuntersuchungen

## Beurteilung der Materialien

### Haar-Referenzmaterialien aus eigener Herstellung

Mit den vorgestellten Verfahren (Kap. 3.2.3) war es möglich, 13 Einzelspendermaterialien herzustellen. Die Bandbreite der verfügbaren Konzentrationen lag dabei von < LOQ bis über 600 pg/mg. Die erhaltenen relativen Standardabweichungen lagen meist unter 20 %, nur in vier Fällen wurde eine größere Inhomogenität beobachtet (zwei Materialien davon < LOQ).

Bei den hergestellten und überprüften Haarpools lag die relative Standardabweichung in jedem Fall < 10 %. Die Konzentration der Materialien lag um die 20 pg/mg. Somit konnten erfolgreich Haarmaterialien definierter Konzentration und definierten Gehaltes hergestellt werden. Einige dieser Materialien wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente eingesetzt (Tabelle 20).

### Haar-Referenzmaterialien der Firma Medichem Diagnostica

Die Beurteilung der Materialien der Fa. Medichem Diagnostica konnte in zwei Bereiche aufgeteilt werden: authentische Materialien und dotierte Materialien.

#### *Authentische Materialien*

Diese Materialien wiesen EtG-Gehalte von 6,5 - 70,6 pg/mg auf. Mit relativen Standardabweichungen von 3,0 - 17,0 % konnten alle diese Gesamtheiten als homogen bezeichnet werden.

#### *Dotierte Materialien*

Die nachfolgenden Materialien *Medichem(Dot)-1* bis *Medichem(Dot)-12* bestanden aus EtG-freiem authentischem Haar, auf welches synthetisches EtG oberflächlich aufgebracht wurde (firmeneigenes Verfahren Medichem Diagnostica GmbH).

Zur Extraktion des oberflächlich anhaftenden EtGs wurde die *Mazeration* gegenüber der *Mikropulverisierung* bevorzugt. Der Gehalt von *Medichem(Dot)-1* konnte nicht bestimmt werden, da die entsprechenden Signale < LOD waren. *Medichem(Dot)-2* wurde der Wert 2,1 pg/mg zugewiesen, wobei auch dieser Wert nicht als valide bezeichnet werden kann, da er unterhalb des LOQ liegt. Alle weiteren analysierten Referenzmaterialien wiesen eine hohe Übereinstimmung des zugewiesenen Wertes (Dotierungslevel) mit dem tatsächlich nachgewiesenen EtG-Gehalt auf. Ebenso konnten gute relative Standardabweichungen beobachtet werden (2,7 – 14,3 pg/mg). Ausnahme bildeten die Proben *Medichem(Dot)-2* und *Medichem(Dot)-5* mit relativen Standardabweichungen von 44,6 respektive 27,7 %. Generell konnte für alle dotierten Materialien eine gute Übereinstimmung des tatsächlichen Gehaltes mit dem Zielgehalt bestätigt werden. Auch die gute Reproduzierbarkeit der gemessenen EtG-Gehalte (bis auf einige wenige Ausnahmen) bestätigte die Präzision der verwendeten Analyseverfahren, mit der es möglich war, sehr genau EtG-Gehalte zu reproduzieren.

### **4.2.3 Ringversuche der SoHT zur Bestimmung von EtG in Haaren**

Die Society of Hair Testing (SoHT) führt jährlich Ringversuche unter anderem auch für den Analyten EtG durch. Die Teilnahme an Ringversuchen stellt eine ausgezeichnete Möglichkeit dar, die Genauigkeit des verwendeten Verfahrens zu überprüfen. Daher nahmen wir an den Ringversuchen der Jahre 2012, 2013 und 2014 teil. Dabei kam 2012 das GC-MS-Verfahren zum Einsatz, 2013 und 2014 das optimierte HPLC-MS/MS-Verfahren (Kap. 3.3). Eine weitere wichtige Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Homogenitätsuntersuchung von Teilen der ausgegebenen Haarmaterialien und somit der Bestimmung der Eignung als Ausgabematerial für die Ringversuche. Dabei war nicht möglich, über die Materialbezeichnungen der im Vorfeld untersuchten Materialien Rückschlüsse auf die tatsächlich ausgegebenen Proben zu ziehen. Die Ergebnisse dieser Homogenitätsuntersuchungen sind in Kapitel 4.2.2 dargestellt.

Vorab kann bereits erwähnt werden, dass die von uns ermittelten Werte aller Proben der drei Ringversuche sehr gut mit den Sollwerten für die Einschätzung der Messfähigkeit übereinstimmten.

Die Teilnahme war demnach erfolgreich. Diese Ergebnisse konnten vergleichbar einer externen Validierung gewertet werden, die die Richtigkeit der eingesetzten Verfahren belegte.

Zur Beurteilung von teilnehmenden Laboratorien wurden folgende Maßstäbe angelegt:

- Ausreißertest nach Grubbs aller übermittelten Werte [101, 102]
- Sollwert entspricht dem ausreißerfreien Mittelwert aller Laboratorien
- Berechnung der Horwitz-Standardabweichung aus dem Sollwert [103]

$$\%VK = 2 (1 - 0,5 \log(c))$$

%VK     relativer Variationskoeffizient nach Horwitz  
c        Konzentration, in diesem Falle der Sollwert

- Berechnung der Unsicherheit des Sollwertes

$$u_{SW} = \frac{SD_{RV}}{\sqrt{n}}$$

$u_{SW}$      Unsicherheit des Sollwertes  
 $SD_{RV}$    Vergleichsstandardabweichung aus dem Ringversuch  
n        Teilnehmerzahl

- Liegt der ermittelte Wert innerhalb der Grenzen  $x \pm u_{SW}$  ist er per Definition nicht vom Sollwert zu unterscheiden.
- Berechnung des z-Scores aus der Standardabweichung nach Horwitz und dem Sollwert

$$z = \frac{x_{LAB} - x_{REF}}{\sigma}$$

z        z-Score  
 $x_{LAB}$    Ermittelter Wert aus Laboratorium  
 $x_{REF}$    Sollwert  
 $\sigma$      Standardabweichung nach Horwitz

- Durch Einsetzen von  $z = 2$  erhält man die Ober- und Untergrenzen der Werte für  $x_{LAB}$ , bei denen die Laboratorien noch bestehen [104]

## Ringversuch 2012

Zur Bestimmung von EtG lagen folgende Proben vor:

- Vier Haarproben (A - D)
- Drei wässrigen EtG-Standards (STD-1 – STD-3)
- Drei Haarextrakten (EXT-1 – EXT-3)

Die Aufgabenstellung lautete:

- 1) Bestimmung des EtG-Gehaltes der Proben A - D, der EtG-Standards und der Haarextrakte
- 2) Erstellung einer Drei-Punkt-Kalibriergerade aus den Ergebnissen der Haarextrakte als externe Kalibrierung ohne internen Standard

- 3) Neuberechnung der Analysenergebnisse für die Haarproben A-D mit der unter 2) erhaltenen externen Kalibrierung

### Ergebnisauswertung der Haarproben A - D

Nach Mazeration erfolgte die Analyse der Proben mittels GC-MS (s. Kap. 3.3.3 und 3.2.1). Proben und Extrakte wurden vor der Aufarbeitung bzw. Analyse in jeweils zwei Aliquote geteilt. In der Tabelle 22 sind die Ergebnisse für die Proben A-D gezeigt.

Tabelle 22: Ergebnisse der EtG-Bestimmung des SoHT-Ringversuches 2012

Probennummer	A	B	C	D
Aliquot 1	28,5	77,8	61,2	52,9
Aliquot 2	27,8	70,7	57,9	49,3
<b>Mittelwert</b>	<b>28,2</b>	<b>74,3</b>	<b>59,5*</b>	<b>51,1</b>
Sollwert	38,7	68,6	58,0	49,3
Unsicherheit Sollwert	2,60	3,61	5,50	1,33
z-Score	-0,77	0,30	0,05	0,25
Sollstreuung (Z Score $\leq 2,00$ )	11,2 - 66,2	30,4 - 106,8	-1,2 - 117,2	35,0 - 63,6

Alle Ergebnisse in pg/g, z-Score dimensionslos, z-Score-Akzeptanzkriterium  $\leq 2,00$

\* Unter Berücksichtigung der Unsicherheit des Sollwertes ist der ermittelte Wert nicht vom Sollwert zu unterscheiden.

Die gemittelten Ergebnisse für die *Proben A* bis *D* lauteten 28,2, 74,3, 59,5 und 51,1 pg/mg EtG. Die Übersicht über die ermittelten Werte aller Laboratorien für *Probe C* in der Abbildung 21 soll exemplarisch verdeutlichen, wie gut der ermittelte Wert zum Sollwert passt.

Der im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Messwert (gekennzeichnet als BAM) ist in der Abbildung 21 mit einem blauen Kreis markiert. Die Labornummern wurden aus Gründen der Anonymität entfernt. Man sieht, dass die Ergebnisse aller teilnehmenden Laboratorien von etwa 10 bis 110 pg/mg EtG reichen. Die blaue Linie stellt den Sollwert dar und kommt somit dem vermuteten wahren Gehalt am nächsten. Dieser betrug 59,5 pg/mg. Per Definition ist der ermittelte Wert unter Berücksichtigung der Unsicherheit des Sollwertes nicht von diesem zu unterscheiden (Sollwert = 58,0 pg/mg).

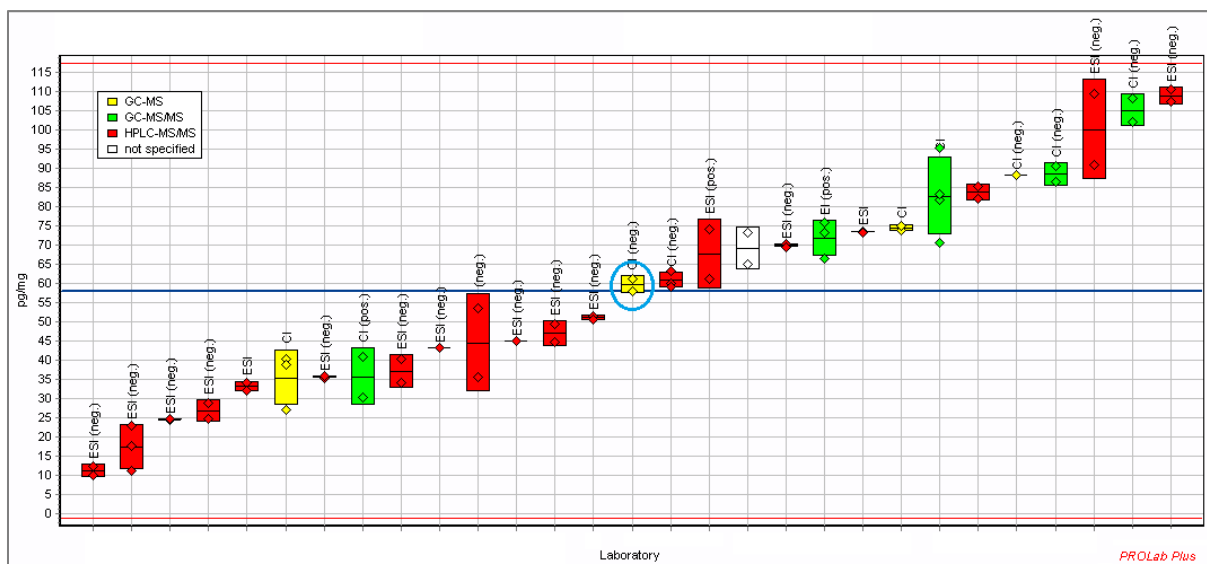


Abbildung 21: Ergebnisse Ringversuch EtG SoHT 2012, Probe C

blaue Linie: Sollwert, rote Linien: Sollstreuungen; BAM: blauer Kreis in der Mitte; größere Version in Anhang A-6

### Ergebnisauswertung der Standards und externe Kalibrierung

Für die Standards 1 bis 3 ergaben sich Messergebnisse von 1,2, 5,2 und 20,2 pg/mg EtG (Tabelle 23).

Tabelle 23: Ergebnisse der EtG-Bestimmung der wässrigen Standards des SoHT-Ringversuches 2012

Probennummer	STD-1	STD-2	STD-3
Aliquot 1	1,2 *	5,1	20,2
Aliquot 2	1,2 *	5,2	19,9
<b>Mittelwert</b>	<b>1,2 *</b>	<b>5,2</b>	<b>20,0</b>
Sollwert	1,08	4,86	18,91
Unsicherheit Sollwert	0,08	0,22	0,78
z-Score	0,37	0,28	0,32
Sollstreuung (z-Score ≤ 2,00)	0,42 - 1,74	2,79 - 6,92	11,89 - 25,93

Alle Ergebnisse in ng/mL, z-Score dimensionslos, Akzeptanzkriterium ≤ 2,00; \* < LOQ;

Eine weitere Aufgabe des Ringversuches war es, die Proben A - D über eine externe Kalibrierung auszuwerten, welche mit Hilfe der ausgehändigten Haarextrakte EXT-1 - 3 gewonnen wurde. Da die Proben A - D gravimetrisch erfasst wurden und somit nie zweimal die gleiche Einwaage vorlag, musste zur Herstellung einer Vergleichbarkeit eine Normierung der Peakflächen (area under the curve, AUC) auf die Einwaage erfolgen. Zu diesem Zweck wurde die AUC für EtG durch die Einwaage der Probe und die von EtG- $d_5$  durch die Einwaage des internen Standards dividiert und zwar sowohl für Proben A - D, als auch für die Haarextrakte EXT-1 - EXT-3. Im Anschluss wurde erneut der Quotient der beiden AUCs gebildet und gegen die errechnete Konzentration der Haarextrakte aufgetragen.

Die Kalibriergerade ist in Abbildung 22, die neu berechneten Ergebnisse für A - D sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

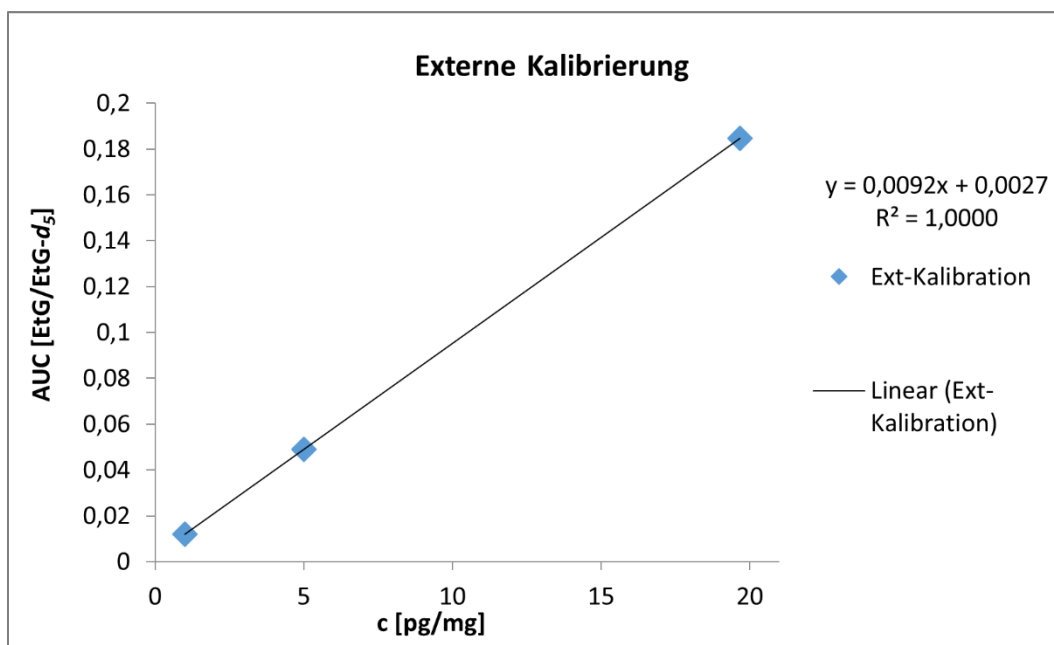


Abbildung 22: Externe Kalibrierung mit den Extrakten EXT-1 bis EXT-3  
Kalibrierpunkt 1  $\leq$  LOQ, dennoch sehr Übereinstimmungsfaktor  $R^2$

Die Kalibriergerade zeigt einen linearen Verlauf. Der Korrelationskoeffizient  $R^2$  wurde mit 1,0000 berechnet (vier Nachkommastellen).

Tabelle 24: Ergebnisse der EtG-Bestimmung: externe Kalibrierung, SoHT-Ringversuch 2012

Probennummer	A	B	C	D
EtG-Gehalt [pg/mg] Lösemittelkalibrierung	28,2	74,3	59,5	51,1
EtG-Gehalt [pg/mg] Externe Kalibrierung	<b>26,5</b>	<b>71,3*</b>	<b>57,0*</b>	<b>48,8</b>
Differenz [%]	6,0	4,0	4,2	4,5
Sollwert	38,08	68,22	57,98	50,26
Unsicherheit Sollwert	2,60	3,61	5,50	1,33
z-Score	-0,770	0,163	-0,030	-0,180
Sollstreuung (z-Score $\leq$ 2,00)	8,05 - 68,11	30,31 - 106,13	-5,15 - 121,12	33,80 - 66,73

Alle Ergebnisse in pg/g, z-Score dimensionslos, z-Score-Akzeptanzkriterium  $\leq$  2,00

\*Unter Berücksichtigung der Unsicherheit des Sollwertes ist der ermittelte Wert nicht vom Sollwert zu unterscheiden.

Die Ergebnisse weichen nur marginal voneinander ab. Die prozentualen Differenzen der Mittelwerte betrugen mindestens 4,0 und höchstens 6,0 %. Somit ist es zumindest für diesen Fall unerheblich, ob eine Matrix- oder eine Lösemittelkalibrierung vorgenommen wird. Aus Gründen der besseren Handhabbarkeit ist eine Lösemittelkalibrierung im Allgemeinen der Matrixkalibrierung vorzuziehen, sofern beide das gleiche Ergebnis liefern.

Insgesamt konnte die Teilnahme an dem SoHT-Ringversuch zur Bestimmung von EtG in Haaren 2012 als erfolgreich gewertet werden: In jedem Fall wurden z-Scores  $< 1,00$  erhalten. Das ließ auf eine valide und verlässliche Methode zur Extraktion und quantitativen Bestimmung von EtG schließen. Sogar EtG-Gehalte  $< \text{LOQ}$  konnten noch sicher bestimmt werden (siehe Kalibriergerade externe Kalibrierung,

Abbildung 22). Diese Tatsache impliziert auch eine gewisse Robustheit der Bestimmung von EtG-Gehalten unterhalb der eigentlichen Bestimmungsgrenze. Ebenso ist dies ein weiterer Hinweis auf die Effektivität der durchgeführten Maßnahmen zur Methodenverbesserungen des HPLC-Verfahrens.

### Ringversuch 2013

Der Ringversuch für EtG im Jahr 2013 der SoHT stand im Zeichen des Vergleiches der Probenvorbereitung von geschnittenen zu gemahlten Haarproben. Zu diesem Zweck wurden auch erstmals trocken vorgemahlene Proben ausgegeben. Insgesamt lieferte die SoHT in Kooperation mit Medichem Diagnostica 10 Proben à 100 mg, wovon je fünf in geschnittener und fünf in gemahlener Form vorlagen. Die Proben wurden in Aliquote zu je 50 mg geteilt und nach Analyse der Mittelwert gebildet.



Abbildung 23: Ringversuchsproben der Society of Hair Testing im RV 2013

ETG-A	} geschnitten	ETG-F	} gemahlen
ETG-B		ETG-G	
ETG-C		ETG-H	
ETG-D		ETG-I	
ETG-E		ETG-J	

Um eine Vergleichbarkeit der geschnittenen und pulverisierten Proben herstellen zu können, wurde die *Mazeration* für beide Probenarten gewählt. Trennung und Detektion erfolgten im Gegensatz zum Ringversuch 2012 mit dem bereits vorgestellten, modifizierten HPLC-MS/MS-Verfahren. Auf eine Waschung wurde verzichtet, da das dem Ringversuch beiliegende Schreiben expliziert die Nicht-Waschung forderte. Alle Proben waren bereits vorgewaschen. In folgender Tabelle 25 sind die Ergebnisse ebenso wie die Sollwerte, Sollstreuungen und z-Scores nach Horwitz dargestellt.

Tabelle 25: Ergebnisse der Proben EtG-A bis EtG-J des SoHT-Ringversuches 2013

Probe	Gehalt (pg/mg)	Sollwert (pg/mg)	Unsicherheit Sollwert (pg/mg)	z-Score	Sollstreuung (pg/mg)
EtG-A	<b>55,2</b>	52,5	1,80	0,21	26,33 - 78,68
EtG-B	<b>62,7</b>	71,5	3,50	-0,52	33,45 - 105,46
EtG-C	<b>11,2*</b>	12,1	1,26	-0,25	4,57 - 19,61
EtG-D	<b>24,0</b>	23,7	1,43	0,05	10,37 - 36,99
EtG-E	<b>37,6*</b>	40,0	2,89	-0,23	19,22 - 60,75
EtG-F	<b>30,8</b>	27,0	1,95	0,51	12,13 - 41,88
EtG-G	<b>19,8</b>	22,9	1,36	-0,47	9,97 - 35,85
EtG-H	<b>43,8</b>	50,6	2,86	-0,53	25,22 - 75,93
EtG-I	<b>78,1</b>	82,5	4,28	-0,23	44,06 - 120,89
EtG-J	<b>37,3</b>	49,9	2,15	-1,00	24,82 - 74,93

z-Score-Akzeptanzkriterium  $\leq 2,00$

\* Unter Berücksichtigung der Unsicherheit des Sollwertes ist der ermittelte Wert nicht vom Sollwert zu unterscheiden.

Im Falle der Proben *EtG-A*, *EtG-C*, *EtG-D*, *EtG-E* und *EtG-I* waren die relativen Abweichungen kleiner als 10 % des Mittelwertes der jeweiligen Probe, der aus allen teilnehmenden Laboren ermittelt wurde. Die erhaltenen z-Scores waren bei jeder analysierten Probe  $\leq 1,00$ , was sehr gute Übereinstimmung mit dem Sollwert bescheinigte. Bis auf die Proben *EtG-A* und *EtG-D* wurde systematisch weniger EtG detektiert, als im Labordurchschnitt. Die Abweichungen waren bei den pulverisierten Proben mit durchschnittlich 14,3 % größer als bei den geschnittenen Proben, bei denen die Abweichung im Schnitt

nur 6,4 % betrug. Da die Analytik zu diesem Zeitpunkt bei den meisten Laboren nicht routinemäßig auf gemahlene Haarproben umgestellt gewesen sein dürfte - zuvor wurde in der Regel nur geschnitten - könnte das ein Grund für die größere Abweichung sein. Unser Labor mahlte zu diesem Zeitpunkt bereits routinemäßig alle Proben. Es soll erwähnt sein, dass eigene Vor- und Homogenitätsuntersuchungen einen maßgeblichen Teil zu der Tatsache beitrugen, dass die generelle Empfehlung der SoHT<sup>9</sup> zur Mahlung von Haaren ausgesprochen wurde. Aus diesen Ergebnissen ließ sich nämlich ableiten, dass durch Mahlung ein größerer Anteil an EtG extrahiert werden kann, als durch bloßes Schneiden der Haare.

Abschließend zum Ringversuch 2013 soll beispielhaft die Verteilung der Messergebnisse aller Labore am Beispiel der Probe *EtG-A* für die nicht-gemahlene Proben und an Probe *EtG-I* für die gemahlene Proben dargestellt werden. Siehe dazu auch Abbildung 24 und Abbildung 25.

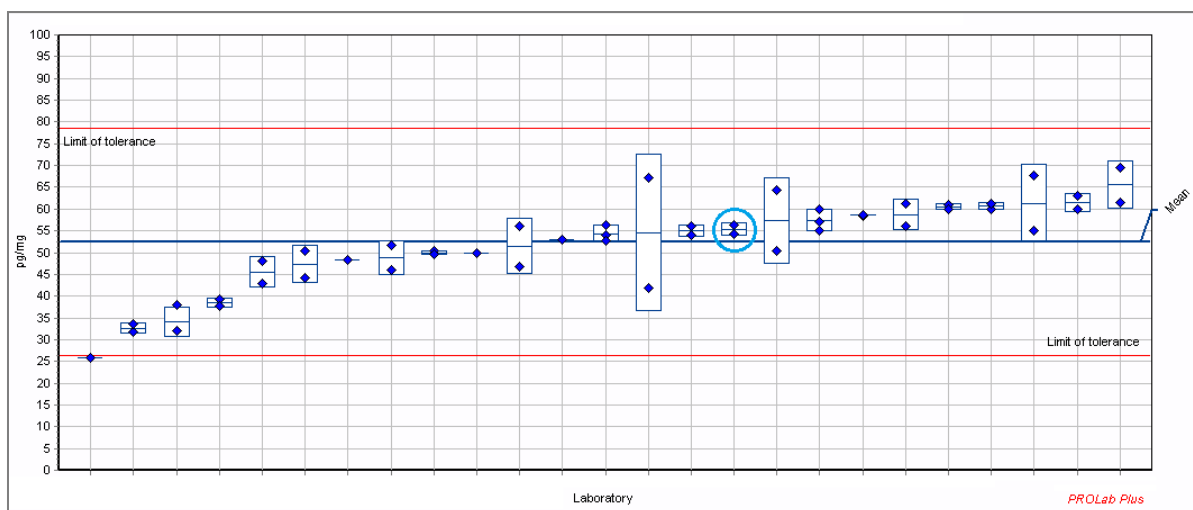


Abbildung 24: Ergebnisse Ringversuch EtG SoHT 2013, Probe *EtG-A*

blaue Linie: Sollwert, rote Linien: Sollstreuungen; BAM: blauer Kreis in der Mitte; größere Version in Anhang A-6

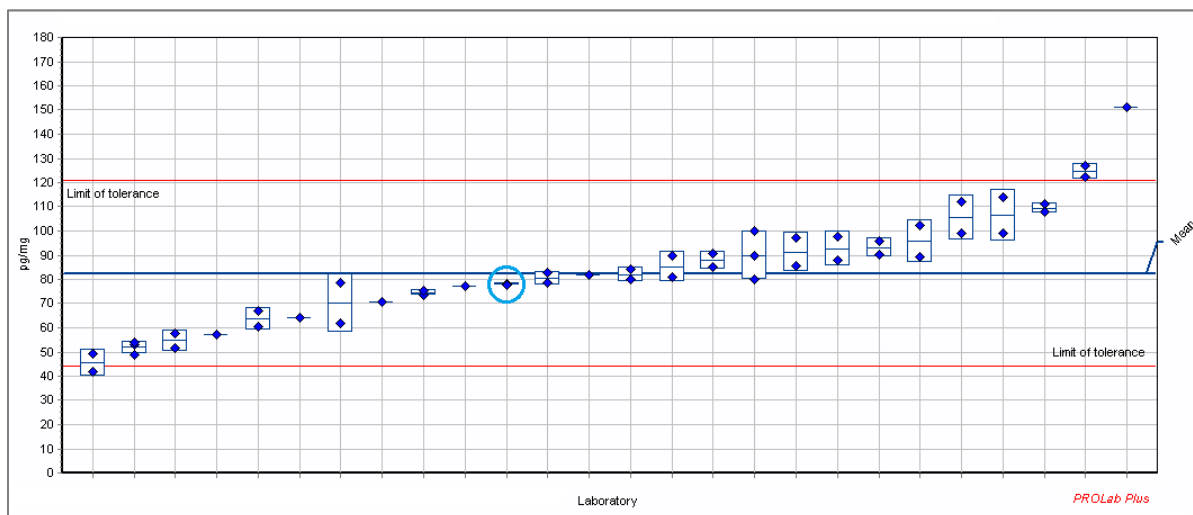


Abbildung 25: Ergebnisse Ringversuch EtG SoHT 2013, Probe *EtG-I*

blaue Linie: Sollwert, rote Linien: Sollstreuungen; BAM: blauer Kreis in der Mitte; größere Version in Anhang A-6

<sup>9</sup> 2016 Consensus for the Use of Alcohol Markers in Hair for Assessment of both Abstinence and Chronic Excessive Alcohol Consumption ([www.soht.org](http://www.soht.org))



In X-Richtung sind die teilnehmenden Labore aufgetragen, in Y-Richtung die detektierte EtG-Gehalte. Unser Befund betrug 55,2 pg/mg (blauer Kreis), der Labormittelwert 52,5 pg/mg. Somit lagen die Ergebnisse auch in diesem Ringversuch wieder sehr nah am Sollwert, auch unter Verwendung der HPLC-MS/MS-Kopplung anstatt der GC-NCI-MS-Kopplung.

Der Sollwert für EtG-I lag bei 82,48 pg/mg. Unser Ergebnis wurde zu 78,1 pg/mg berechnet. Auch hier lag der ermittelte Wert sehr nahe am Sollwert (-5,3 %). Ebenso wie der Ringversuch 2012 zeigt auch dieser, dass wir in der Lage waren, bei geschnittenen, aber auch bei gemahlenen Proben die EtG-Gehalte sehr genau abzubilden.

Die vorliegenden Ergebnisse anhand des Ringversuches der SoHT zu EtG in Haaren beweisen somit eine hervorragende Eignung des modifizierten HPLC-Verfahrens für die Detektion von EtG im Haar.

## Ringversuch 2014

Der EtG-Ringversuch der SoHT 2014 beinhaltete nur drei Proben mit jeweils 100 mg Inhalt. Bei zweien (*EtG-A* und *EtG-B*) handelte es sich um geschnittene Haarproben unbekannten Gehaltes, so wie auch schon aus den Ringversuchen zuvor bekannt. Bei der dritten Probe (Probenbezeichnung *ALMC 12A H-a*) handelte es sich um ein vom Hersteller nach GUM-Richtlinien<sup>10</sup> zertifiziertes Material mit einem EtG-Gehalt von 50,6 pg/mg und einer Unsicherheit von 5,6 pg/mg. Die Durchführungsempfehlung schlug die Mahlung aller Proben vor der Extraktion vor. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der übermittelten Werte durch Extraktion nach Mahlung zustande kamen.

Tabelle 26: Ergebnisse der EtG-Bestimmung des SoHT-Ringversuches 2014

<i>Probennummer</i>	<i>EtG-A</i>	<i>EtG-B</i>	<i>ALMC 12A H-a<sup>a</sup></i>
Aliquot 1	11,3	30,9	52,2
Aliquot 2	11,2	37,7	50,6
<b>Mittelwert</b>	<b>11,3</b>	<b>34,3</b>	<b>51,4</b>
Sollwert	8,66	29,40	50,6 <sup>b</sup>
Unsicherheit Sollwert	0,53	1,46	-
z-Score	0,91	0,61	-
Sollstreuung (z-Score ≤ 2,00)	3,00 - 14,33	13,41 - 45,40	45,0 - 56,2 <sup>c</sup>

Alle Ergebnisse in pg/g, z-Score dimensionslos, z-Score-Akzeptanzkriterium ≤ 2,00, <sup>a</sup> keine offizielle Ringversuchsprobe: Auslieferung von Medichem Diagnostica zusammen mit den Ringversuchsproben;

<sup>b</sup> zertifizierter Wert nach GUM; <sup>c</sup> zertifizierter Wert ± Unsicherheit; z-Score-Akzeptanzkriterium ≤ 2,00

Nach Aliquotierung in 2 × 50 mg wurde dem *2016 Consensus for the Use of Alcohol Markers in Hair for Assessment of both Abstinence and Chronic Excessive Alcohol Consumption* der SoHT folgend, durch *Mikropulverisierung* extrahiert, um dem wahren EtG-Gehalt näher zu kommen. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 26 dargestellt.

Bemerkenswerterweise ließ sich keine der Proben nach Mikropulverisierung wie üblich ohne Weiteres filtrieren. Dieser Effekt wurde ebenfalls schon öfter bei Haaren beobachtet, die durch oxidative Behandlung verändert wurden. Ob gebleichte Haarproben in den Materialien vorlagen, war nicht bekannt, dennoch musste der Extrakt filtrierbar gemacht werden. Durch viermaliges Zentrifugieren in einer Minispin®-Zentrifuge bei 13000 rpm für jeweils 10 Minuten konnte der Extrakt soweit von kleinsten Partikeln befreit werden, sodass eine Filtrierbarkeit möglich wurde. Jedoch ging ein Anteil an Extrakt durch das mehrmalige Umfüllen von einem Zentrifugengefäß ins nächste verloren. Um genügend Extrakt zur Filtration und anschließend auch zur Dreifachbestimmung zu erhalten, wurde

<sup>10</sup> GUM: ISO/BIPM-Leitfaden *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, maßgebliche deutsche Fassung: Vornorm DIN V ENV 13005: *Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen*.

zuerst der Extrakt in einer 1-mL-Spritze aufgenommen und durch den Filter gepresst. Dieser wurde anschließend entfernt, dann 300 µL Reinwasser in die gleiche Spritze gefüllt, der Filter wieder aufgesetzt und nachgespült. So konnte zum einen sichergestellt werden, dass ein Großteil des auf dem Filter adsorbierten EtG-Extraktes wieder hinuntergespült werden konnte und zum anderen eine zur Analyse ausreichende Probenmenge vorhanden war. Somit traten Verdünnungseffekte auf. Trotz des abgewandelten Verfahrens war es möglich, valide Bestimmungen der EtG-Gehalte durchzuführen. Generell lag der bestimmte Mittelwert etwas höher, als der Sollwert. Eine mögliche Erklärung ist das hocheffiziente Mahl- und Extraktionsverfahren, welches verwendet wurde. Im Vergleich zur trockenen Mahlung und anschließender Extraktion scheinen sich Vorteile zu ergeben. Anhand der Ergebnisse aller Laboratorien in Abbildung 26 soll dieser Effekt nochmals verdeutlicht werden.

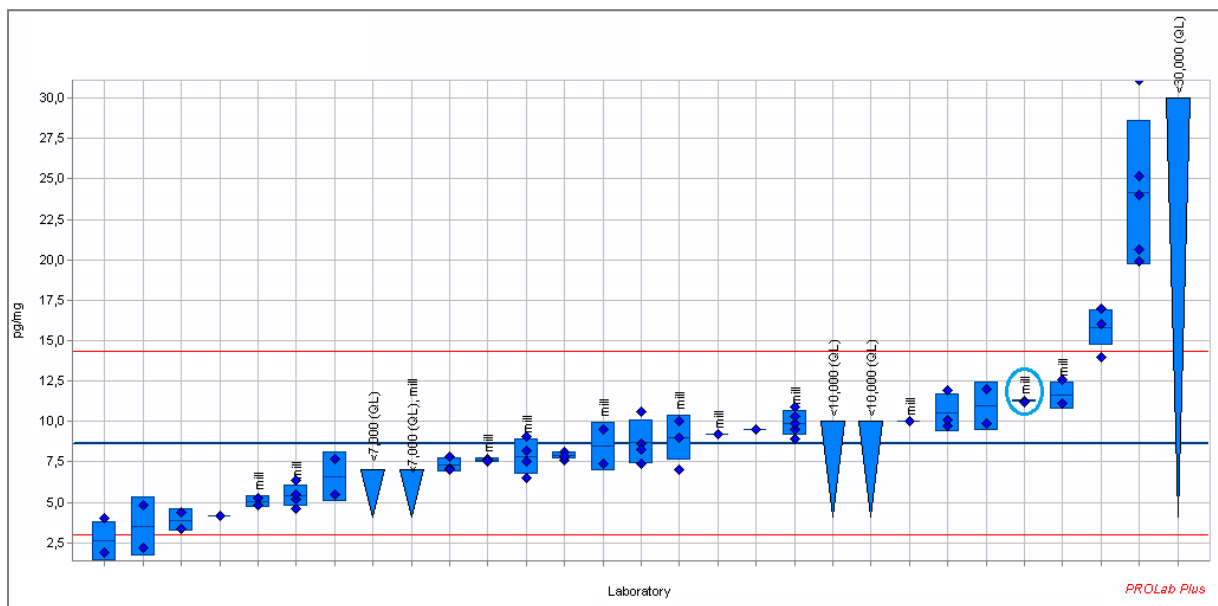


Abbildung 26: Ergebnisse Ringversuch EtG SoHT 2014, Probe EtG-A

blaue Linie: Sollwert, rote Linien: Sollstreuungen; BAM: blauer Kreis in der Mitte; größere Version in Anhang A-6

Mit einem gemessenen EtG-Gehalt von 51,4 pg/mg liegt der gemessene Wert für das zertifizierte Material ALMC 12A H-a nur + 0,8 pg/mg über dem zertifizierten Wert von 50,6 pg/mg. Das entspricht etwa 1,6 % Abweichung. Der Wert wurde also sehr genau reproduziert, was eine Bestätigung der Richtigkeit des verwendeten Analysenverfahrens ist.

### Resümee der SoHT-Ringversuche zu EtG 2012, 2013 und 2014

Die Ergebnisse der Ringversuche können folgendermaßen zusammengefasst werden:

Die Platzierung unseres Labors innerhalb der Ringversuchsergebnisse zeigt deutlich, dass die verwendeten Methoden - *Mazeration* und *Mikropulverisierung* - auf Probenvorbereitungsseite und *GC-NCI-MS* und *HPLC-MS/MS* auf der Seite der Analysenverfahren geeignet für die Bestimmung von EtG in der komplexen Matrix Haar sind. Bei allen Versuchen lagen die eigenen Ergebnisse dicht an den Sollwerten mit z-Scores generell  $\leq 1,00$ . Vor dem Hintergrund der Bestehensgrenze von  $z \leq 2,00$  lieferten wir sehr genaue und valide Ergebnisse ab. Die Mahlung führte bei den Teilnehmern zu höheren EtG-Ausbeuten als andere Verfahren. Unser Verfahren (*Mikropulverisierung*) kann wegen der hohen Richtigkeit als Referenzverfahren angesehen werden. Diese Aussage wird von den vorliegenden Ringversuchsergebnissen bewiesen. Zusätzlich zu den Ringversuchen wurde durch systematische Homogenitätsuntersuchungen dazu beigetragen, dass in der aktuellen Empfehlung der SoHT zur Analyse von EtG in Haaren zur Mahlung der Proben geraten wird, um die Extraktionseffizienz zu steigern.

#### 4.2.4 Langzeitstabilität von EtG in Haaren - beschleunigte Alterung

Die vorausgegangenen Kapitel machen deutlich, dass große Mengen homogenen EtG-haltigen Haar-Referenzmaterials in der Analytik wichtig für die Qualitätssicherung sind, z.B. als sogenannte *Quality controls* (QCs), welche zur regelmäßigen Überprüfung des Messverfahrens dienen. Besondere Bedeutung kommt diesen Materialien auch beim Führen von Qualitätsregelkarten und bei Validierungsmessungen zu. EtG-Haarproben mit einem verlässlich konstanten EtG-Gehalt sind unverzichtbar.

Für die EtG-Analytik in Haaren sind Grenzwerte, sog. Cut-offs, von der Society of Hair Testing festgelegt [48]. Diese beziehen sich auf das kopfhautnahe (proximale) Skalphaar eines Segments von 3-6 cm Länge und lauten:

< 7 pg/mg:	abstinent
< 30 pg/mg:	wiederholter Alkoholkonsum
> 30 pg/mg:	chronisch übermäßiger Alkoholkonsum

Matrix-Referenzmaterialien werden i.d.R. aus einer größeren Menge an Startmaterial dargestellt. Dabei ist es bei Haaren oft eine Herausforderung, rein authentische Materialien so zu verschneiden, dass ein homogenes Endprodukt mit definiertem Sollwert entsteht. Deshalb stellt die Aufstockung eines authentischen Leerhaares eine Option zur Herstellung großer Chargen mit festgelegtem und konstantem EtG-Gehalt dar. Da diese über einen längeren Zeitraum kommerziell genutzt oder als Qualitätskontrollen verwendet werden sollen, ist neben der Homogenität auch ein besonderes Augenmerk auf die Stabilität des Materials zu legen. Da es selten möglich ist, ein hergestelltes Material viele Jahre lang zu lagern, um danach eine Aussage über die Stabilität zu treffen, wird es für kürzere Perioden bei höheren Temperaturen eingelagert, um das Verhalten des Analyten abzuschätzen. Zu diesem Zwecke wurden zwei Materialien nach internationalen Richtlinien des ISO Guide 35 [105] eingelagert und getestet. Diese werden im Folgenden vorgestellt:

Bei *Material 1* handelte es sich um inkorporiertes authentisches Material (*Medichem-1*, siehe Kapitel 4.2.2). Das Anreicherungsverfahren ist Firmengeheimnis von Medichem Diagnostica. Die Homogenität wurde bestimmt, als die Mikropulverisierung noch nicht etabliert war. Als Extraktionsmethode kam die *Mazeration* (Kapitel 4.1.1) zum Einsatz. Als Analysenmethode zur EtG-Detektion diente die GC-NCI-MS. Der erhaltene Mittelwert lag bei  $70,6 \pm 2,1$  pg/mg ( $n = 26$ ). Mit 3,0 % relativer Standardabweichung der Messwerte konnte das Material als sehr homogen angesehen werden.

*Material 2* war ein rein authentisches Material ohne weitere Inkorporation oder Dotierung mit EtG (*Medichem-6*). Die Homogenitätsbestimmung fand unter Verwendung des HPLC-MS/MS-Verfahrens nach *Mikropulverisierung* statt. Das Ergebnis der Studie lautete  $25,1 \pm 2,2$  pg/mg ( $n = 20$ ). Das entsprach einer relativen Standardabweichung der Messwerte von 13,7 %. Das Material wies eine für den Versuch ausreichend hohe Homogenität auf.

#### Beschleunigtes Altern

Die Einlagerung jeweils zweier Probenflaschen (A und B) eines jeden Materials (1 und 2) erfolgte bei unterschiedlichen Lagerbedingungen. Dabei variierte zum einen die Lagertemperatur, als auch die Lagerzeit. In jeder Flasche befanden sich 100 mg Haarmaterial der Länge 1 - 2 mm. Da zur Analyse jeweils 50 mg verwendet wurden, ergab dies vier Bestimmungen für jeden Zeitpunkt bei jeder Temperatur. Das Probenregime ist aus Tabelle 27 ersichtlich. Zusammen mit vier Rückstellprobenflaschen bei -22 °C pro Material lag die eingelagerte Gesamtzahl an Probenflaschen bei 88 Stück, entsprechend Haarmaterial für 176 Einzelanalysen.

Tabelle 27: Probenregime zur Untersuchung der Langzeitstabilität von EtG in Haaren

<i>Temperatur</i> <i>Lagerzeit</i>	-22 °C	4 °C	20 °C	40 °C	60 °C
<b>1 Monat</b>	-	✓	✓	✓	✓
<b>3 Monate</b>	-	✓	✓	✓	✓
<b>6 Monate</b>	-	✓	✓	✓	✓
<b>12 Monate</b>	✓	✓	✓	✓	-
<b>24 Monate</b>	✓	✓	✓	✓	-

Dem isochronen Versuchsprinzip folgend [106], erfolgte eine Umlagerung der Probenflaschen nach Ablauf der vorgesehenen Lagerdauer zu den Referenzproben bei -22 °C. Es erfolgte eine gesammelte Analytik mittels HPLC-MS/MS nach Mikropulverisierung nach 12 und nach 24 Monaten aller bis zu diesem Zeitpunkt zurückgelagerten Probengebänden. Folgende Kriterien wurden besonders überwacht:

- Die Analytik der Proben fand an mehreren Tagen statt. Es erfolgten tagesaktuelle Kalibrierungen, welche 24 Stunden lang gültig waren. Bei Überschreitung dieser Analysezeit erfolgte eine neue Kalibrierung. Insgesamt waren 11 Analysentage notwendig, um den EtG-Gehalt alle Proben zu quantifizieren. Es wurden 10-Punkt-Kalibrierungen von 1,0 - 151,1 pg/mg durchgeführt. Die Korrelationskoeffizienten reichten von 0,9952 bis 0,9977.
- Die Analytik der Haarproben erfolgte unter gleichen Bedingungen. Je Material und Lagerbedingung lagen zwei Probenflaschen A und B vor. Es erfolgte eine Aliquotierung des Inhaltes jeder Probenflasche in zwei gleich große Teile, welche zeitlich getrennt voneinander zur Analyse gelangten. Diese Maßnahme diente zur Eliminierung eventuell auftretender Drifteffekte am Gerät. Die Vorgehensweise ist in Tabelle 28 veranschaulicht.
- Substanzverschleppung durch den Autosampler wurde durch die Injektion von Blank-Proben nach je 30 Proben bzw. Qualitätskontrollen ausgeschlossen. Die Abwesenheit des EtG-Signals in diesen Proben wurde genau überwacht.
- Alle 20 Injektionen erfolgte eine Dreifachbestimmung von abwechselnd QC-LOW (6,9 pg/mg) und QC-MED (29,9 pg/mg) (siehe Kapitel 3.3.1).

Tabelle 28: Analysenschema extrahierter Haarproben

<i>Temperatur</i> <i>Lagerzeit</i>	-22 °C	4 °C	20 °C	40 °C	60 °C
<b>1 Monat</b>		● A B	A B	A B	A B
<b>3 Monate</b>		A B	A B	A B	A B
<b>6 Monate</b>		A B	A B	A B	A B
<b>12 Monate</b>	A B	A B	A B	A B	
<b>24 Monate</b>	A B	A B	A B	A B	

## Ergebnisse

Alle hier präsentierten Ergebnisse liegen als Publikation bei Forensic Science International unter folgendem Titel vor: *Stability of ethyl glucuronide in hair reference materials after accelerated aging* [107].

Aus früheren Experimenten [108, 109] war bekannt, dass organische Analyten im Spurenbereich bei Lagerung bei erhöhten Temperaturen (40 - 60 °C) in trockener Matrix einem konstanten Abbaumechanismus folgen. Die Vermutung lag nahe, dass auch EtG einem ersichtlichen Abbau unterliegen sollte. Die Lagerung erfolgte deshalb bei bis zu 60 °C für bis zu 24 Monate. Ein beobachteter Abbau würde sich auf längere Zeitspannen extrapolieren lassen. So wären Aussagen über den verbleibenden EtG-Gehalt nach einer bestimmten Zeitdauer möglich [109]. Die Materialien 1 und 2 werden im Verlauf gesondert dargestellt.

### Material 1 (inkorporiert)

Bei Material 1 ließ sich zu allen Zeiten und Temperaturen kein Trend zu niedrigeren EtG-Gehalten beobachten. Bei 60 °C zeigt sich jedoch ein leicht reduzierter EtG-Gehalt gegenüber allen anderen Proben. Dieser Rückgang war nach statistischer Überprüfung mittels F-Test ( $\alpha = 0,01$ ) nicht signifikant. Somit konnte kein Lagerungseffekt beobachtet werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind als Balkendiagramm (Abbildung 27) dargestellt. EtG unterlag unter diesen Bedingungen im vorliegenden inkorporierten Haarmaterial - zumindest im beobachteten Zeitraum - keinem auffälligen Abbau.

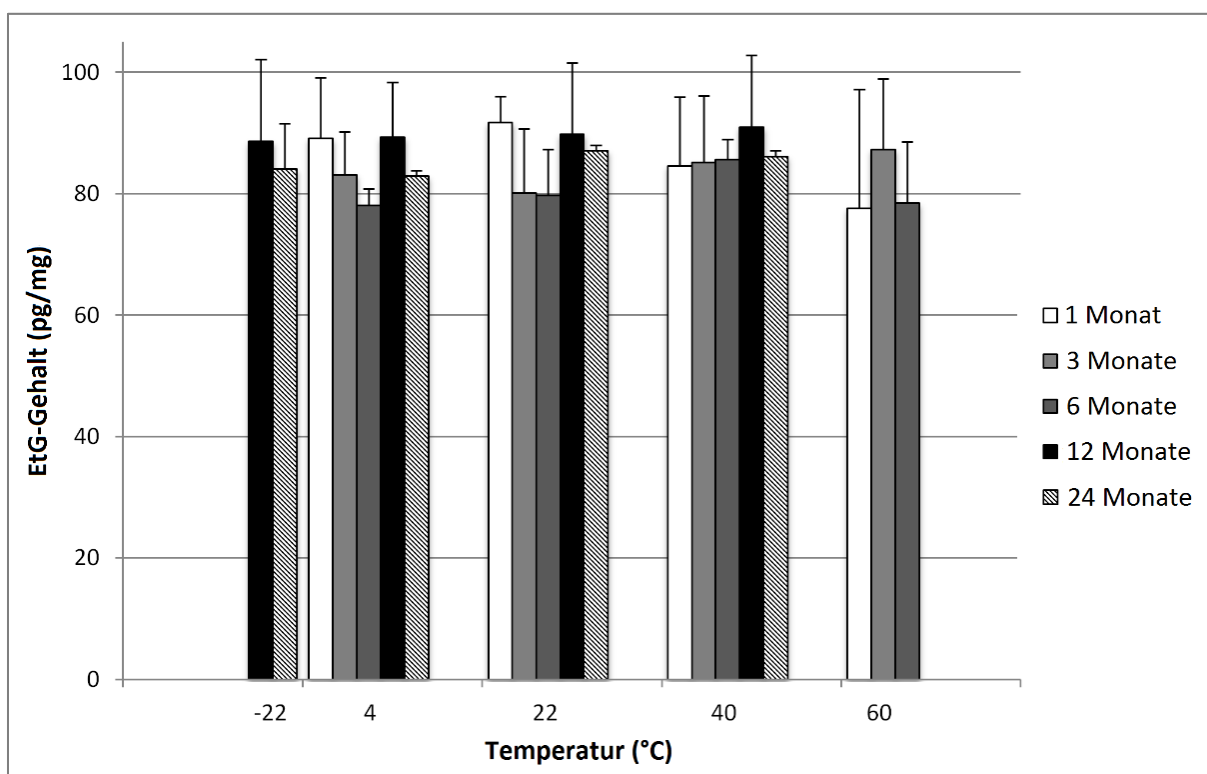


Abbildung 27: Darstellung der EtG-Gehalte von Haarmaterial 1 mit inkorporiertem EtG-Gehalt Lagerung bei -22, 4, 22, 40 und 60 °C

### Material 2 (authentisch)

Das authentische, nicht angereicherte Material 2 zeigte jedoch einen unerwarteten Trend zu höheren EtG-Gehalten nach der künstlichen Alterung. Eine einfaktorielle ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) zeigte, dass der gesamte Datensatz inhomogen war, sowohl unter Ausschluss der Referenzproben bei -22 °C ( $F = 4,2964$ ,  $F_{\text{KRIT}} = 1,8231$ ), als auch unter Einbeziehung dieser ( $F = 3,8410$ ,  $F_{\text{KRIT}} = 1,7753$ ). Ein anschließender Neumanns-Trend-Test ließ jedoch keinen signifikanten Trend hin zu höheren EtG-

Werten erkennen, die aus Proben bei Lagertemperaturen zwischen 4 °C und 60 °C generiert wurden. Auch zeigte das Einbeziehen der erhaltenen Referenzwerte bei -22 °C keine Änderung an diesem Ergebnis, welches aus Abbildung 28 ersichtlich ist.

Obwohl die Stärken des Trendtestes nach Neumann in längeren Datenreihen von 10 und mehr Datensätzen liegen, kann er doch ab vier Datensätzen angewendet werden. Obwohl der Trend nicht statistisch signifikant war, fielen dennoch die erhöhten Werte auf, welche gegen Ende der maximalen Lagerzeit von 24 Monaten auftraten.

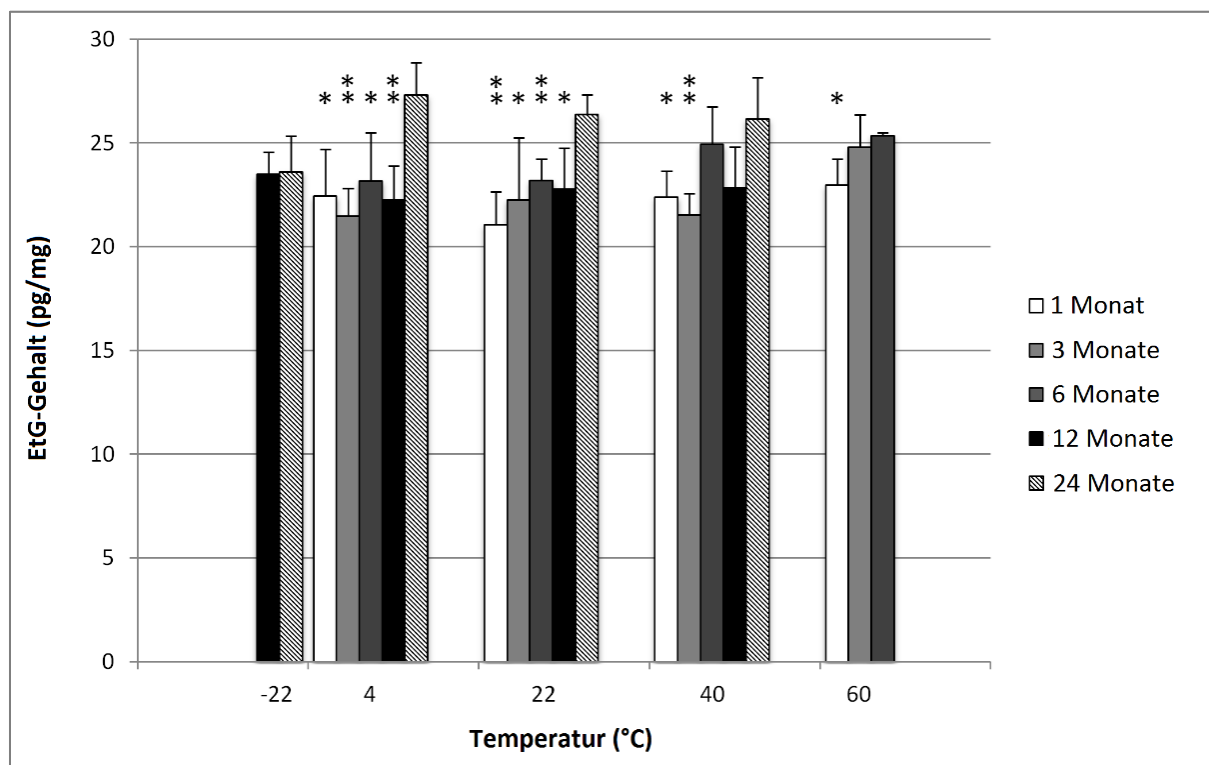


Abbildung 28: Darstellung der EtG-Gehalte von Haarmaterial 2 mit authentischem EtG-Gehalt Lagerung bei -22, 4, 22, 40 und 60 °C; signifikante Unterschiede zu den Referenzmessungen nach 24 Monaten: T-Test, \*\*p < 0,01, \*p < 0,05

Die Gehalte der Referenzproben nach Lagerung bei -22 °C waren immer signifikant niedriger, als die Messwerte bei allen anderen Temperaturen nach 24 Monaten ( $\alpha = 0,05$ ; T-Test) mit Ausnahme der Lagerung bei 60 °C, für die keine Einlagerung länger als sechs Monate erfolgte. Der Vergleich fand mit den erhaltenen EtG-Gehalten der längsten Lagerzeit bei dieser Temperatur statt: sechs Monate.

Die Ergebnisse dieser Studie legten die Vermutung nahe, dass die trockene Lagerung von authentischen Haarproben mit einem EtG-Gehalt im Spurenbereich bei erhöhten Temperaturen die Art und Weise, wie EtG in die Matrix eingebunden ist, veränderte. Diese Vermutung wurde zum einen durch die Tatsache gestützt, dass beim authentischen, nicht angereicherten Material 2 ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (s.o.) mit Tendenz zu höheren Werten festgestellt werden konnte. Zum anderen aber auch durch das Nichtvorhandensein dieses Effektes bei Material 1, bei welchem kein natürlich eingelagertes EtG vorlag und welches künstlich auf einen EtG-Gehalt von  $86,1 \pm 16,0$  pg/mg (Mittelwert Referenzproben 12 und 24 Monate bei -22 °C) angereichert wurde. Als Konsequenz dieses Effektes lag eine erhöhte Nachweisbarkeit des EtGs vor, welche mit zunehmender Lagertemperatur und -zeit zu höheren Messwerten führte. Je höher die Lagertemperatur, desto früher trat dieser Effekt auf (vgl. z.B. 60 °C und 6 Monate mit 4 °C und 24 Monate). Da diese Beobachtung bei allen beobachteten Temperaturen festgestellt werden konnte, schien es sich tatsächlich um einen temperaturgetriebenen, echten Effekt zu handeln und nicht um eine Zufallsbeobachtung.

Die Stabilität von EtG in der Haarmatrix erscheint beachtlich, verglichen mit anderen Umweltproben organischer Analyten im Spurenbereich [108]. Gänzlich unbekannt ist die bemerkenswerte Stabilität von EtG in trockener Haarsubstanz allerdings nicht. Während auch die ungenügende Stabilität des Analyten gegenüber wässriger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung [107, 110, 111] und Thioglycolsäure in Verbindung mit Hitze [111] gut dokumentiert ist, gibt es Nachweise, dass EtG in menschlichen Geweben (Haar, Leber, Niere, Blut [37]) unter geeigneten Bedingungen sogar noch 27 Jahre nach dem Tod nachgewiesen werden kann.

Die Schlussfolgerung aus diesem Experiment lautet, dass trockene, EtG-haltige Haarproben auch für die Dauer von mehreren Jahren nicht bei besonders niedrigen Temperaturen gelagert werden müssen. Eine trockene Lagerung wird auf Basis der in diesem Versuch herrschenden Bedingungen empfohlen. Der Effekt einer gewissen EtG-Mobilisierung von zuvor nicht-extrahierbaren Anteilen konnte auf Grund dieses Projektes nicht ausgeschlossen werden und sollte als Möglichkeit berücksichtigt werden. Sie lässt sich durch Lagerung bei niedrigen Temperaturen verlangsamen.

#### 4.3 Beiträge zur Entwicklung eines antikörperbasierten Schnelltestes für EtG in Haaren

In Kooperation mit der Universität Potsdam und der Firma Medichem Diagnostica GmbH war der Fachbereich 1.2 der BAM gleichberechtigter Partner im ZIM-finanzierten Projekt *Antikörper-basiertes Schnelltestverfahren für die Bestimmung von EtG in Haar*<sup>11</sup>.

Ziel des Zusammenschlusses war die Entwicklung und Etablierung eines ausreichend sensitiven Anti-EtG-Antikörpers zur Feststellung exzessiven Alkoholkonsums nach Extraktion aus der Haarmatrix. Obwohl EtG sehr verlässlich mittels GC-MS- und HPLC-MS/MS- Verfahren detektiert werden kann, stehen diesem Analysenverfahren doch hohe Kosten durch Geräte-Anschaffung und laufende Kosten gegenüber. Zusätzlich benötigt eine Analyse mit den genannten Verfahren viel Zeit und ist ortsgebunden. Mit einem sog. ELISA (ELISA = enzyme linked immunosorbent assay) ist es möglich, die Detektion einer Vielzahl von Analyten auf engstem Raum (z.B. 96-Well-Platte) und ohne großen gerätetechnischem Aufwand zu detektieren [112]. Es gibt sogar Anwendungen, bei denen nicht einmal ein UV-Vis-Spektrometer notwendig ist. Sie sind somit portabel. Prominentestes Beispiel ist mit Sicherheit der Schwangerschaftstest, welcher innerhalb von Minuten ein visuelles Feedback mit einer hohen Zuverlässigkeit erzeugt. Die Motivation zur Entwicklung eines solchen Schnelltestes für EtG im Haar war die schnelle Erzeugung einer Ja/Nein-Aussage zum Konsum bedeutender Alkoholmengen, z.B. bei der Abstinenzüberwachung. So könnte man teure Gerätezeit einsparen, solange es nur auf qualitative Aussagen ankommt. Die Funktion eines solchen ELISAs ist in Abbildung 29 am Beispiel eines Sandwich-ELISAs dargestellt. Ein solcher Assay gliedert sich allgemein in folgende Schritte:

- A) Beschichtung der Reaktionsgefäße mit dem Coating-Antikörper
- B) Inkubation mit der potentiellen Analyt-Lösung
- C) Zugabe des Detektions-Antikörpers
- D) Zugabe des Detektions-Antikörper-Antikörpers (bei IgGs z.B. IgG-Antikörper)
- E) Zusatz eines Substrates, welches durch das gekoppelte Enzym an Antikörper aus Schritt D zu einem Farbstoff umgesetzt wird

Im Projekt übernahm die Universität Potsdam alle anfallenden biotechnologischen Aufgaben, angefangen bei der Antigensynthese zur Erstellung des Antikörpers, über die Produktion und Reinigung desselben bis hin zum Aufbau des Nachweissystems. Medichem Diagnostica war maßgeblich an der Entwicklung unterschiedlichster Haarmaterialien beteiligt, während die BAM Aufgaben im Bereich der Extrakterstellung und -analyse, Charakterisierung diverser Antigene, Synthese und Reinigung von benötigten modifizierten Antigenen, Stabilitätsvaluierung des Analyten, der Referenzanalytik sowie der Analyse von möglichen Kreuzreaktanden übernahm.

In diesem Kapitel sollen Arbeiten und Ergebnisse, an denen die BAM direkt beteiligt war, gezeigt und diskutiert werden. Ergebnisse bzgl. der entstandenen Antikörper können und dürfen an dieser Stelle aus patenschutzrechtlichen Gründen nicht dokumentiert werden. Die Publikation dieser Aspekte obliegt der Universität Potsdam in Rücksprache mit dem Kooperationspartner Medichem Diagnostica.

---

<sup>11</sup> Gefördert durch das Zentrale Innovationsprogramm Mittelschicht (ZIM) des Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie (BMWi), Förderkennzeichen: KF2201048SK2



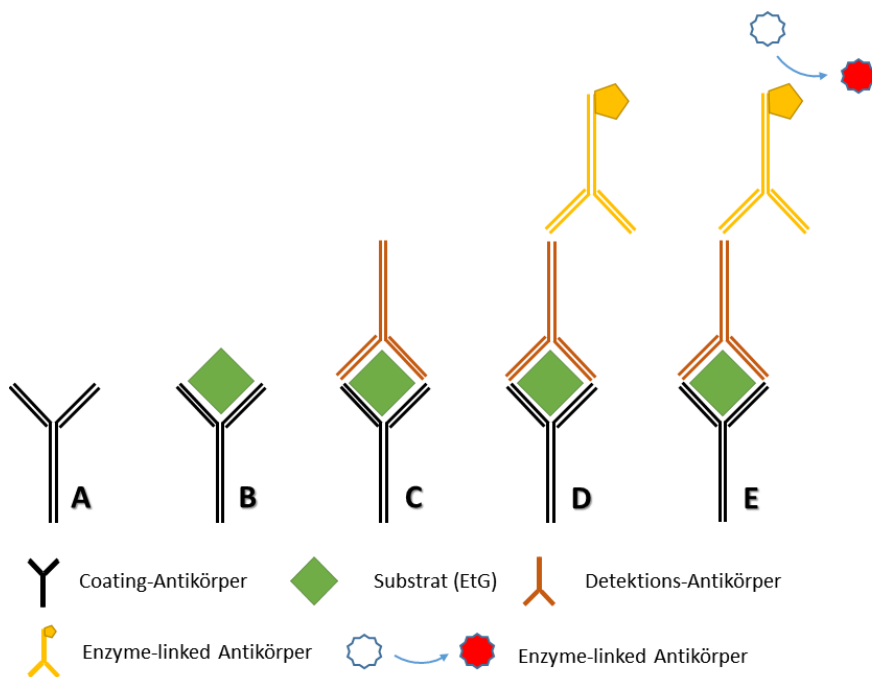


Abbildung 29: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISAs, eigene Arbeit

- A:** Beschichtung der Kavitäten mit dem Coating-Antikörper
- B:** Inkubation mit dem Substrat (EtG)
- C:** Inkubation mit einem Detektions-Antikörper
- D:** Inkubation mit dem Enzyme-linked-Antikörper (erkennt Detektions-Antikörper)
- E:** Umsetzung eines Substrates in einen Farbstoff: je höher die Konzentration an EtG, je höher der Umsatz an Farbstoff

#### 4.3.1 Herstellung von Haarextrakten zur Evaluierung der EtG-Antikörper

Haarextrakte definierten Gehaltes waren unerlässlich zur Evaluierung des Testaufbaus und des Antikörpers. Solche Extrakte wurden von uns in unterschiedlichen Konzentrationen her- und zur Verfügung gestellt. Dabei variierten der EtG-Gehalt der zu extrahierenden Haarmaterialien, die Menge, die Extraktionsart und das Lösungsmittel, um verschiedene Aspekte der Antikörper-EtG-Bindung zu untersuchen. Im Wesentlichen erfolgte die Extraktion dreier Materialien: ESM-4 (520,4 pg/mg), ESM-6 (1,6 pg/mg) und ESM-10 (22,5 pg/mg) (Kap 4.2.2). Im späteren Verlauf des Projektes kamen auch die Extrakte dreier EtG-freier Haare von Medichem Diagnostica zum Einsatz: MC 7843, MC 7844 und MC 7845.

Die eingesetzten Extraktionsverfahren waren die *Mazeration* und die *Mikropulverisierung*, die verwendeten Extraktionsmittel Wasser und Phosphat-Puffer (phosphate buffered saline, PBS). Teilweise wurde auch das Haarmaterial ESM-6 mit EtG gespiked, um definierte EtG-Level zu erreichen. In Tabelle 29 sind alle hergestellten Extrakte aufgelistet und beschrieben. Ebenso sind die resultierenden Konzentrationen in der Lösung berechnet.

Alle angefertigten Extrakte wurden zum Testaufbau und zur Evaluierung an die Universität Potsdam übermittelt und dort getestet. Der finale Anti-EtG-Antikörper war letztendlich in der Lage, EtG in PBS, Haarextrakten und künstlichem Urin (Produkt von Medichem Diagnostica, noch nicht kommerziell erhältlich) zu detektieren.

Tabelle 29: Hergestellte Haarextrakte für die Evaluierung von EtG-Antikörpern

<i>Haarmaterial</i>	<i>Extraktionsart</i>	<i>Einwaage Haare (mg)</i>	<i>Einwaage Extraktionsmittel (mg)</i>	<i>Konzentration der Lösung (pg/mg)</i>	<i>Äquivalenzkon- zentration im Haar (pg/mg)</i>
<i>ESM-4</i>	mikro	50,0	600	43,37	520,4
	mikro	50,0	600	43,37	520,4
	maz	46,8	468	44,96	449,6 *
	mikro	50,3	503	44,98	449,8
<i>ESM-6</i>	mikro	50,0	600	blank	blank
	mikro	50,0	600	blank	blank
	maz	48,5	485	blank	blank
	maz	59,8	598	blank	blank
	maz	49,7	497	blank	blank
	mikro	45,7	457	blank	blank
	mikro	59,6	596	blank	blank
	mikro	52,6	526	blank	blank
	maz, spike	53,8	466	50,89	508,9
	maz, spike	50,6	468	50,89	508,9
	maz, spike	48,2	470	50,89	508,9
	maz, spike	47,0	441	100,74	1007,4
	maz, spike	55,9	430	100,74	1007,4
	maz, spike	48,2	440	100,74	1007,4
	maz, spike	49,8	375	201,52	2015,2
	maz, spike	50,6	373	201,52	2015,2
	maz, spike	50,8	373	201,52	2015,2
	maz, spike	51,2	602 **	99,61	1170,3
	maz, spike	49,5	603 **	49,39	601,7
	maz, spike	49,4	603 **	29,58	361,0
	maz, spike	49,3	604 **	19,89	243,6
	maz, spike	48,6	602 **	9,75	120,7
	maz	50,5	604 **	blank	blank
	maz	51,7	603 **	blank	blank
	mikro, spike	49,4	603 **	98,87	1206,4
	mikro spike	51,9	602 **	49,38	572,7
	mikro, spike	50,6	602 **	29,54	351,7
	mikro, spike	50,2	599 **	19,98	238,4
	mikro, spike	48,8	600 **	9,95	122,3
	mikro	50,5	601 **	blank	blank
	mikro	50,0	602 **	blank	blank
<i>ESM-10</i>	mikro	50,0	600	1,88	22,5
	mikro	50,0	600	1,88	22,5
	maz	51,3	513	ca. 2,19*	ca. 22,5 *
	mikro	48,5	485	2,19	22,5
	maz	57,9	500	ca. 2,25*	ca. 22,5 *
	maz	47,1	500	ca. 2,25*	ca. 22,5 *
	maz	50,7	500	ca. 2,25*	ca. 22,5 *
<i>MC 7843</i>	maz	1970	19700 **	blank	blank
<i>MC 7844</i>	maz	1970	19700 **	blank	blank
<i>MC 7845</i>	maz	2000	20000 **	blank	blank

Extraktionsmittel: Wasser; maz: Mazeration; mikro: Mikropulverisierung; spike: Leerhaar mit Kalibrator geeigneten Levels gespiked; \* Schätzwert, da Gehalt auf Mikropulverisierung beruht; \*\* Extraktionsmittel: PBS-Puffer

#### 4.3.2 Glucuronide als potentielle Kreuzreaktanden im ELISA: Massenspektrometrische Untersuchungen

Wie bereits einleitend im vorangegangenen Kapitel dargestellt, wurden potentielle Kreuzreaktanden ausgewählt und untersucht. Die Auswahl der Substanzen verlief nach der Überlegung, dass der in Potsdam hergestellte Antikörper wahrscheinlich auf Strukturverwandte zu EtG reagiert. Da der größte Strukturanteil des Ethylglucuronids aus der Glucuronsäure stammt und tatsächlich nur die Ethoxylierung am anomeren Kohlenstoffatom einen Beitrag zum strukturellen Unterschied zu dieser liefert, wurde vermutet, dass als Kreuzreaktanden hauptsächlich Glucuronide anderer Substanzen, wie z.B. von Arzneistoffen, Pflanzeninhaltsstoffen oder auch körpereigenen Substanzen in Frage kämen. Zu diesem Zwecke wurden 10 verschiedene, kommerziell erhältliche Glucuronide ausgewählt und analysiert. Einige dieser Substanzen wurden bereits in biologischen Matrices untersucht, z.B. in Blut, Urin, Haar und Galle, bei anderen wurden umfassende Studien zum Effekt dieser Substanzen auf den menschlichen Körper durchgeführt. Ein Überblick über die ausgewählten Substanzen ist in Tabelle 30 und Abbildung 30 dargestellt.

Tabelle 30: Übersicht über alle untersuchten glucuronidierten Substanzen

<i>Substanz</i>	<i>exakte Masse (g/mol)</i>	<i>Ionisierungs- modus ESI</i>	<i>Literatur*</i>
4-Acetaminophenyl- $\beta$ -D-glucuronid (Paracetamol)	327,10	$\ominus$	[113-116]
Acetylsalicylsäure-acyl- $\beta$ -D-glucuronid (Aspirin)	356,07	$\ominus$	[117-125]
Kaffeensäure-3- $\beta$ -D-glucuronid	356,07	$\ominus$	-
Kaffeensäure-4- $\beta$ -D-glucuronid	356,07	$\ominus$	-
Carvedilol- $\beta$ -D-glucuronid	582,22	$\oplus$	[126-130]
Clopidogrel-acyl- $\beta$ -D-glucuronid	483,08	$\oplus$	[131]
Cotinine- $\beta$ -D-glucuronid	352,13	$\oplus$	[132-136]
Propofol- $\beta$ -D-glucuronid	354,17	$\ominus$	[137-143]
Quercetin- $\beta$ -D-glucuronid	478,07	$\ominus$	[144-150]
Serotonin- $\beta$ -D-glucuronid	352,13	$\oplus$	[151-156]

\* Die Literaturstellen dokumentieren die Identifikation der jeweiligen Substanzen in biologischen Matrices menschlichen Ursprungs oder Effekte der Substanzen auf den menschlichen Körper.

Sollte sich eine oder mehrere der aufgeführten Substanzen im Schnelltestverfahren als Kreuzreaktand herausstellen, so ist eine Analytik zur Detektion in der Haarmatrix unerlässlich. Zu diesem Zwecke wurde eine Methode mittels HPLC-MS/MS-Kopplung entwickelt, die die simultane Detektion der Glucuronide möglich machte (Kapitel 3.3.4). Die Optimierung der Substanzen für die Detektion mittels Triple-Quad-MS erfolgte nach Auswahl der durch Fragmentierung der Mutterionen nach Electrospray-Ionisierung (electro spray ionization) bei Kollisionsenergien von 10 bis 140 eV. Dazu wurden sog. Komposit-Massenspektren erzeugt, die einzelne Spektren bei verschiedenen Kollisionsenergien kombinieren.

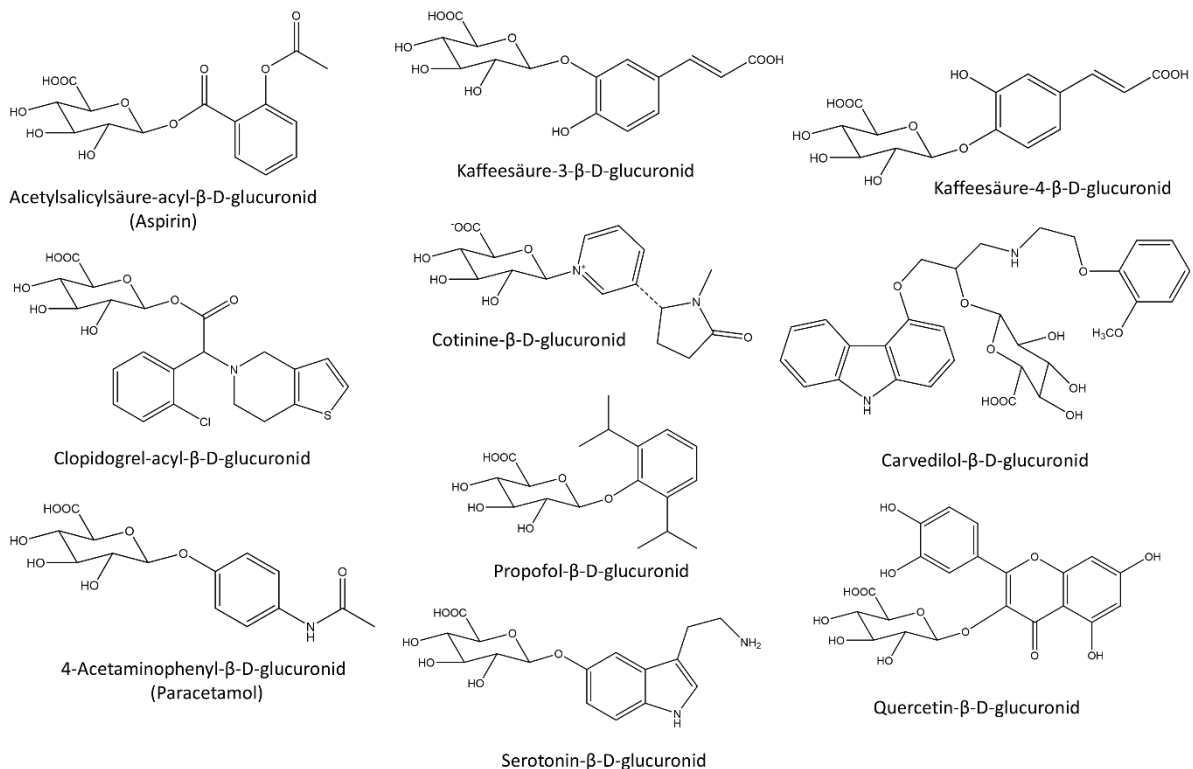


Abbildung 30: Strukturen der untersuchten Glucuronide

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Zusammenstellung der Fragmentierungsmuster und deren Entstehung aus den Substanzen aus Abbildung 30. Die dazugehörigen Massenspektren können im Anhang (Kapitel A-5) eingesehen werden. Das erste Beispiel zeigt die Entstehung der Fragmente bei Ethylglucuronid nach negativer Ionisierung im ESI-Modus. Davon ausgehend, entstand bei allen negativ ionisierten Substanzen ein charakteristisches Zerfallsmuster des Glucuronsäureanteils.

### $\beta$ -D-Ethylglucuronid

In diesem Abschnitt soll am Beispiel des  $\beta$ -D-Ethylglucuronids (EtG) die Fragmentierung des Glucuronsäureanteils erläutert werden, wie sie bei allen untersuchten  $\beta$ -D-Glucuroniden in MS<sup>3</sup>-Konfiguration nach negativer Ionisierung mittels ESI auftrat. Siehe dazu auch Abbildung 31.

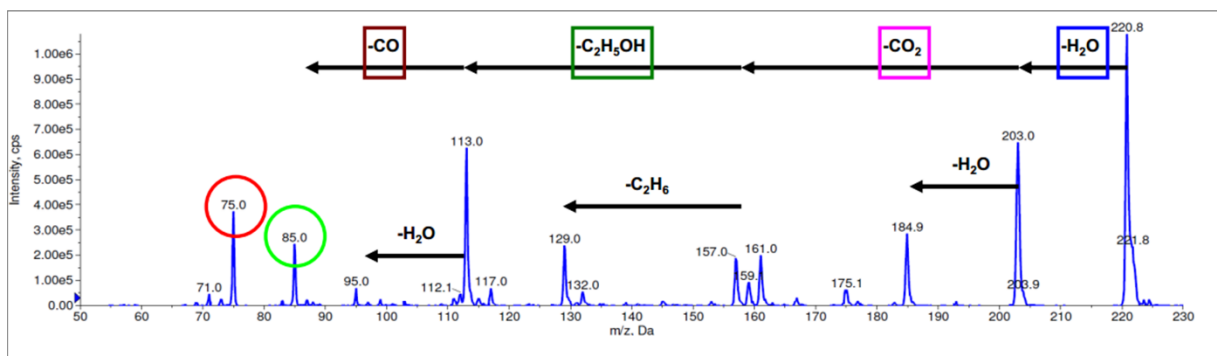


Abbildung 31: Fragmentierung von EtG, ESI-, 500 ng/mL, Abbildung aus [157]

Anhand dieses Massenspektrums (Abbildung 31) konnte folgendes festgestellt werden: Nach Verlust von Wasser, CO<sub>2</sub> und Ethanol entstand das Massenfragment mit m/z = 113, wie es bei allen in Tabelle 30 gezeigten Glucuroniden mit negativer ESI-Ionisierung zu erkennen war. Spaltete sich davon CO

(braun) ab, so entstand das Fragment mit  $m/z = 85$  (grüner Kreis). Nach Wasserabspaltung, ergab sich ein Fragment mit  $m/z = 95$ . Das Signal bei  $m/z = 75$  (roter Kreis) wurde durch das Fragment  $C_2H_3O_3$  verursacht. Weitere Fragmente wurden bei den Masse-Ladungsverhältnissen 175, 161, 117, 71 beobachtet.

### Glucuronide aus Abbildung 30

Die identifizierten Fragmente der in Abbildung 30 vorgestellten Glucuronide werden aufgrund der Vielzahl an Übergängen tabellarisch dargestellt (Tabelle 31). Eine genauere Erläuterung der Entstehung der Fragmente sowie Zerfallsmuster und zugehörige Massenspektren sind in Kapitel A-5 des Anhangs dargestellt.

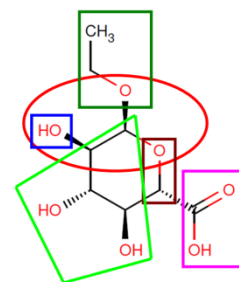


Abbildung 32:  
Fragmentierungsmuster von EtG

Tabelle 31: Beobachtete Massenübergänge aller untersuchten Glucuronide

<i>Analyt</i>	<i>Ionisierungsmodus</i>	<i>Mutterion [m/z]</i>	<i>Hauptfragmente [m/z]</i>	<i>Beschreibung</i>
β-D-Ethylglucuronid	negativ	221	203	Abspaltung von 1 mol H <sub>2</sub> O
			185	Abspaltung von 2 mol H <sub>2</sub> O
			175*	aus Glucuronsäure
			159	Abspaltung von CO <sub>2</sub>
			129	Abspaltung C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>
			113*	Abspaltung von Ethanol
			85*	Abspaltung von CO
			75*	Teil der Glucuronsäure
4-Acetaminophenyl-β-D-glucuronid	negativ	326	281	Abspaltung von Acetat
			150	Spaltung Paracetamol und Glucuronsäure
			134	Spaltung Paracetamol und Glucuronsäure
			57	Acetamid
			43	Acetat
			175, 117, 113, 85, 75	aus Glucuronsäure, siehe EtG
Acetylsalicylsäure-acyl-β-D-glucuronid	negativ	355	312	Abspaltung von Acetat
			178	Spaltung Acetylsalicylsäure und Glucuronsäure
			137	Benzoessäure
			93	Phenolat
			175, 117, 113, 85, 75	aus Glucuronsäure, siehe EtG
Kaffeesäure-3-β-D-glucuronid	negativ	355	336	Abspaltung von 1 mol H <sub>2</sub> O
			311	Abspaltung von CO <sub>2</sub>
Kaffeesäure-4-β-D-glucuronid			286	Abspaltung von Acrylsäure
			180	Abspaltung von Glucuronsäure
			175, 117, 113, 85, 75	aus Glucuronsäure, siehe EtG
Carvedilol-β-D-glucuronid	positiv	583	407	Abspaltung von Glucuronsäure
			282	Abspaltung von 2-Methoxyphenol
			196	Spaltung zwischen C-1 und C-2 des 1,2-Propandiols
			166	Carbazol-4-Hydroxid
			123	2-Methoxyphenol
Clopidogrel acyl-β-D-glucuronid	positiv	484	466	Mutterion - H <sub>2</sub> O
			374 / 111	Spaltung im Dihydropyridin-Thiophen-Heterozyklus
			355	374 - H <sub>2</sub> O
			338	355 - H <sub>2</sub> O
			308	Clopidogrel
			125	Chlor-Tropylium
			111	Chlorphenyl
Cotinin-N-β-D-glucuronid	positiv	353	177	Glucuronsäure / Cotinin
			98	1-Methyl-2-Pyrrolidinon
			78	Pyridin
Propofol-β-D-glucuronid	negativ	353	177	Glucuronsäure / 2,6-Diisopropylphenol
			175, 117, 113, 85, 75	aus Glucuronsäure, siehe EtG
Quercetin-β-D-glucuronid	negativ	477	301	Quercetin
			192	Quercetin - 1,2-Dihydroxybenzol
			151	Quercetin - 1,2-Dihydroxyphenylethanol
			109	1,2-Dihydroxybenzol
Serotonin-β-D-glucuronid	positiv	353	336	Serotonin-β-D-glucuronid - NH <sub>3</sub>
			177	Glucuronsäure / Serotonin
			160	Serotonin - H <sub>2</sub> O
			115	Indol

Nachdem die Zerfallsmuster der Substanzen bekannt waren, wurden pro Analyt drei Übergänge mit den höchsten Intensitäten bzw. eindeutigsten Fragmenten ausgewählt und optimiert. Nach Optimierung aller Ionenquellen- und Ionenoptikparametern wurde eine LC-Methode zur Trennung der Glucuronide erarbeitet (siehe Kapitel 3.3.4). Prinzipiell war es möglich, mit der verwendeten Software (Analyst 1.5.2), positive und negative Perioden in einer Methode zu verwenden, allerdings müssen diese zwingend sequenziell ablaufen. Daher war die Teilung der Analyten in positiv bzw. negativ ionisierende Substanzen sinnvoller. Für jede Klasse lag letzten Endes eine MS-Methode mit identischen LC-Programmen vor. Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die Chromatogramme der untersuchten Glucuronide: Abbildung 33: positive Ionisierung, Abbildung 34: negative Ionisierung.

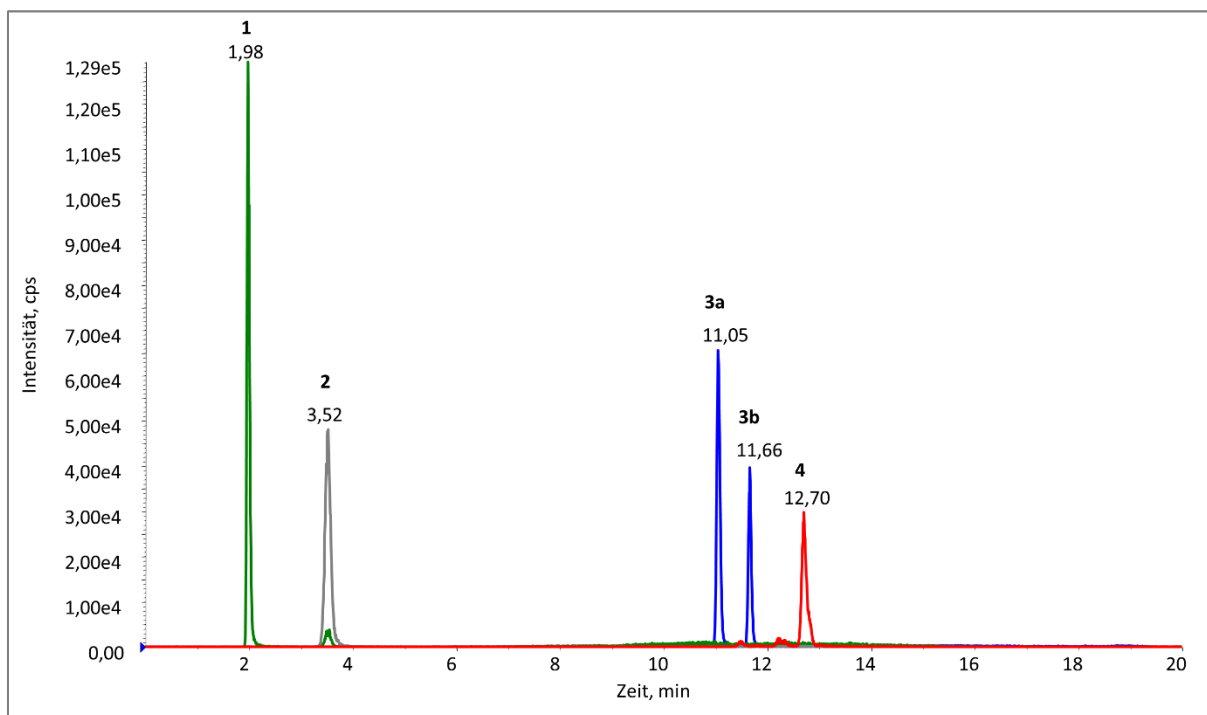


Abbildung 33: Retentionszeiten der positiv ionisierten Glucuronide  
1, Cotinine-N- $\beta$ -D-glucuronid; 2, Serotonin- $\beta$ -D-glucuronid; 3a, 3b, Carvedilol- $\beta$ -D-glucuronid mit Peak-splitting; 4, Clopidogrel- $\beta$ -D-glucuronid

Das Peak-Splitting von Carvedilol- $\beta$ -D-glucuronid (3a und 3b) ist auffällig. Bei Verbindungen mit zwitterionischer Natur (hier Carbonsäure und basischer Stickstoff des Carbazol-Ringsystems) kann deren Gehalt je nach Zusammensetzung des Fließmittels zugunsten der positiv oder negativ geladenen Spezies variieren. Im vorliegenden Fall war das Fließmittel mit 0,1 Vol-% Ameisensäure angesäuert. Denkbar ist also, dass hier der basische Stickstoff nicht vollständig protoniert vorlag. Dies ist vor allem dann möglich, wenn die pKs-Werte der Säure bzw. Base nahe am pH-Wert des Fließmittels liegen. Da ein Ansäuern allerdings maßgeblich für die erreichten Intensitäten der Substanzen am Detektor verantwortlich war, konnte nicht darauf verzichtet werden und das Splitting wurde in diesem Falle in Kauf genommen. Sollte zukünftig eine Quantifizierung mit dieser Methode vorgesehen werden, müssen beide Peakflächen als Summe ausgewertet werden.

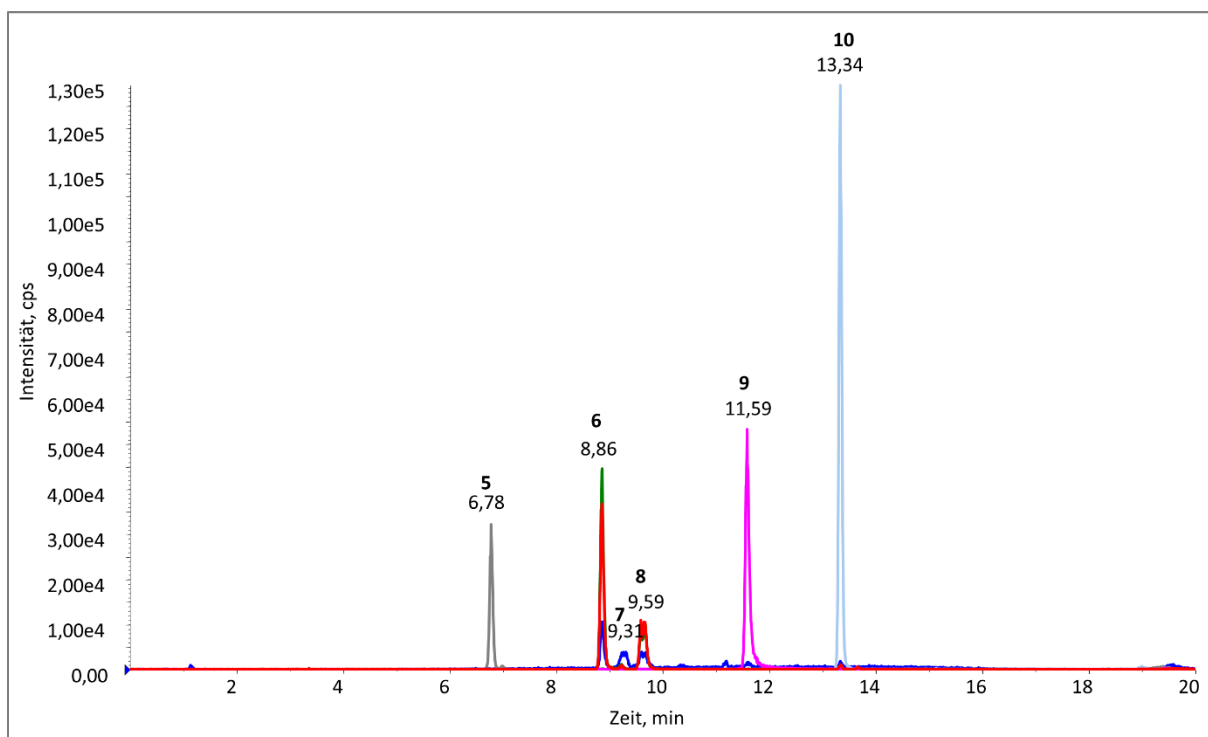


Abbildung 34: Retentionszeiten der negativ ionisierten Glucuronide

5, Paracetamol-4- $\beta$ -D-glucuronid; 6, Kaffeesäure-4- $\beta$ -D-glucuronid; 7, Acetylsalicylsäure-acyl- $\beta$ -D-glucuronid; 8, Kaffeesäure-3- $\beta$ -D-glucuronid; 9, Quercetin-3- $\beta$ -D-glucuronid; 10, Propofol- $\beta$ -D-Glucuronid

In Tabelle 32 sind alle Substanzen und Massenübergänge sowie Retentionszeiten nochmals zusammengefasst. Die LODs aller Substanzen wurden in Wasser bestimmt durch 1:10-Verdünnungen einer Lösung aus 50  $\mu$ L der respektiven Substanz-Stammlösungen in einem Gesamtvolumen von 600  $\mu$ L Wasser. Die niedrigsten analysierten Konzentrationen lagen bei 0,08 bzw. 0,07 ng/mL. Bei Clopidogrel-acyl- $\beta$ -D-glucuronid lag ein Gerätedefekt vor, der nicht schnell genug behoben werden konnte, um das Experiment noch einmal zu wiederholen.



Tabelle 32: Glucuronide mit optimierten Massenübergängen im Überblick  
zugehörige exakte Massen, Peak-Nr., Ionisierungsmodus bei ESI, Retentionszeiten und abgeschätzten LODs

Substanz	Peak #	Exakte Masse (g * mol <sup>-1</sup> )	ESI-Modus	MRM		Retentionszeit (min)	LOD in Wasser (ng/mL)
				Q1	Q3		
Aspirin-acyl-β-D-glucuronid	7	356,07	⊖	354,940	<b>113,0</b> 174,8 136,9	9,31	8,3 < LOD < 83,3
Carvedilol-β-D-glucuronid	3a 3b	582,22	⊕	583,068	<b>407,2</b> 222,1 100,1	11,05 11,66	LOD < 0,08
Clopidogrel-acyl-β-D-glucuronid	4	483,08	⊕	483,982	<b>308,1</b> 198,2 152,1	12,70	-
Cotinin-N-β-D-glucuronid	1	352,13	⊕	352,953	<b>177,1</b> 80,1 146,0	1,98	LOD < 0,08
Kaffeesäure-3-β-D-glucuronid	8	356,07	⊖	354,936	<b>178,8</b> 134,9 112,9	9,59	0,08 < LOD < 0,82
Kaffeesäure-4-β-D-glucuronide	6	356,07	⊖	354,953	<b>178,8</b> 134,8 112,8	8,86	LOD < 0,08
Paracetamol-4-β-D-glucuronid	5	327,10	⊖	325,923	<b>112,9</b> 174,4 149,9	6,78	0,08 < LOD < 0,78
Propofol-β-D-glucuronid	10	354,17	⊖	352,996	<b>176,9</b> 112,9 174,7	13,34	LOD < 0,07
Quercetin-3-β-D-glucuronid	9	478,07	⊖	476,970	<b>300,9</b> 150,9 178,9	11,59	0,08 < LOD < 0,83
Serotonin-β-D-glucuronid	2	352,13	⊕	353,025	<b>160,2</b> 336,1 177,2	3,52	LOD < 0,08

Der optimale Ionisierungsmodus folgte einem logischen Muster: Substanzen, welche einen basischen Stickstoff in der Molekülstruktur vorweisen, ionisieren bevorzugt im positiven Modus, da sie erzeugte Protonen leicht aufnehmen können und die Ladung durch die Protonenakzeptoreigenschaften des Stickstoffes gut stabilisieren können. Alle in dieser Arbeit positiv ionisierten Substanzen besaßen entweder einen basischen Stickstoff oder trugen wie beim Cotinin-β-D-glucuronid eine permanente positive Ladung.

Substanzen, die schlechte Protonenakzeptoren sind, also keine basischen Funktionalitäten aufweisen, können durch Protonen übertragene positive Ladungen nur schlecht stabilisieren. Die hier gezeigten Substanzen, welche im negativen Modus ionisierten, konnten negative Ladung durch Abgabe eines Protons besser stabilisieren (Abgabe eines Protons an der Carboxylfunktion).

#### 4.3.3 Bleichen von Haaren und Einfluss auf den EtG-Gehalt und Entwicklung eines Schnelltestes für oxidativ behandeltes Haar

Die zuverlässige Quantifizierung von EtG in Haaren und die Einordnung in die Cut-off-Werte der SoHT [48] sind essentiell für die Verwendung im rechtsmedizinischen Kontext. Aber auch in Fällen mit strafrechtlichem Bezug, wie z.B. Fahreignungsprüfungen oder Sorgerechtsverhandlungen ist die Richtigkeit produzierter Ergebnisse von höchster Priorität.

Es ist bekannt, dass kosmetische Haarbehandlung mit einhergehendem Bleichen zu einem vollständigen Verlust von EtG im Haar führen kann [158]. Je nach Anwendungsdauer bzw. Stärke der Bleichmittel können zu niedrige oder falsch-negative Messergebnisse entstehen, wenn solche Haarproben in die Analytik gelangen.

Bei einer Haarprobe ist rein äußerlich nicht unbedingt erkennbar, ob ein niedriger EtG-Gehalt durch geringen Alkoholkonsum oder durch Bleichen zustande kommt. Die Zerstörung von EtG durch oxidative Behandlung mit Wasserstoffperoxid in wässriger Lösung konnte bereits in einer Publikation von Kerekes et al. 2012 [159] gezeigt werden. Die vorliegenden Experimente, welche bei Forensic Science International unter dem Titel *Degradation of the ethyl glucuronide content in hair by hydrogen peroxide and a non-destructive assay for oxidative hair treatment using infra-red spectroscopy* veröffentlicht wurden [160], sollen diesbezüglich zwei Fragestellungen beantworten:

- 1) Ist die Oxidation einer Haarprobe durch kosmetische Bleichmittel zerstörungsfrei mit vertretbarem Aufwand detektierbar?
- 2) Wenn ja, in welchem Ausmaß wird EtG durch Bleichbedingungen, wie sie in kommerziellen Produkten vorkommen, abgebaut?

Um Antworten auf diese Fragen zu finden, musste zu 1) eine Methodik zum Nachweis oxidierteter Substanzen in der Haarmatrix entwickelt werden. Mit der Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie konnte eine solche Analysenmethode etabliert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich durch Infrarotspektroskopie Oxidation in Haaren [99, 100, 161] und in Wolle [162-164] nachweisen lässt. Zur Beantwortung von Frage 2) wurden unterschiedliche Haarmaterialien mit verschiedenen Bleichmitteln inkubiert. Dabei variierten der pH-Wert der Lösungen und die Einwirkzeiten. Die Versuche erfolgten an sechs unterschiedlichen, authentischen Haarmaterialien (siehe Kapitel 4.2.2). Der EtG-Gehalt vor und nach Behandlung wurde mit HPLC-MS/MS nach *Mikropulverisierung* analysiert.

#### ATR-FTIR-Analytik

Wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, wurde eine Methode zur Detektion von gebleichten Haarspezies entwickelt. Beim detektierten Analyten handelte es sich um Cysteinsäure, welche durch Oxidation über mehrere Schritte aus dem in der Haarmatrix vorkommenden Cystin entstand. Abbildung 35 zeigt das Reaktionsschema von Cystin zu Cysteinsäure gegeben.

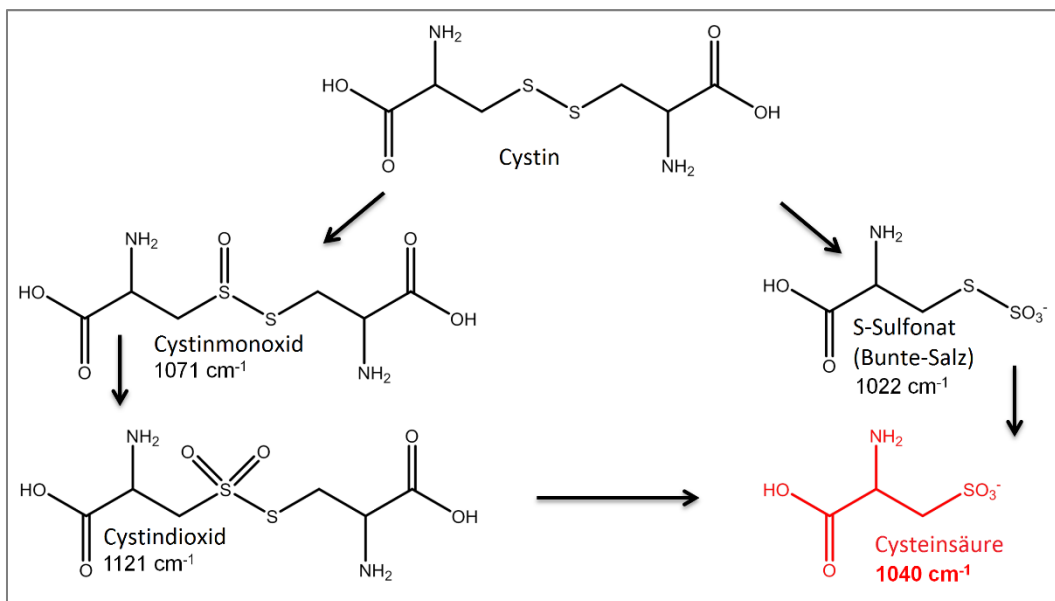


Abbildung 35: Oxidation von Cystin zu Cysteinsäure: zwei Reaktionswege

Es gibt zwei unterschiedliche Reaktionswege zur Bildung von Cysteinsäure aus Cystin [98-100]. Ein Weg führt von Cystin durch Oxidation zu Cystinmonoxid, welches dann weiter zu Cystindioxid reagiert. Nach Spaltung des Thiosulfonates entsteht Cysteinsäure. Dem zweiten Reaktionsweg folgend, entsteht zuerst das so genannte Bunte-Salz. Dabei handelt es sich um das Schwefel-Sulfonat. Durch weitere Oxidation und Abspaltung von  $\text{SO}_3$  entsteht schließlich Cysteinsäure.

Haarproben wurden vor und nach Behandlung pulverisiert und auf den Golden-Gate®-ATR-Kristall eines Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometers aufgebracht. Cysteinsäure konnte bei  $1040\text{ cm}^{-1}$  detektiert werden. Diese Bande entsprach der symmetrischen Streckschwingung der S-O-Bindung und ist in der Literatur gut dokumentiert [98-100]. Abbildung 36 stellt zwei Spektren der Haarprobe HP-3 nach 30 und nach 60 Minuten in Bleichmittel B (10 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 50 mM Tris-HCl pH 8,3) gegenüber. Zur besseren Überschaubarkeit wurde hier nur der Ausschnitt von  $2000$  bis  $900\text{ cm}^{-1}$  gewählt. Die unbehandelte Probe zeigte bei  $1040\text{ cm}^{-1}$  kein Signal, die behandelte Probe ließ bei der gleichen Wellenzahl ein eindeutiges Signal erkennen.

Ebenso gut lassen sich drei verschiedene Amid-Banden erkennen. Die Amid-I-Bande entsprach der C=O Valenzschwingung, die Amid-II-Bande der Deformationsschwingung der Aminogruppe und die Amid-III-Bande wurde durch die C-N-Valenzschwingung verursacht [165]. Die eindeutige Darstellung des Einflusses der Oxidation konnte durch die Bildung der ersten bzw. zweiten Ableitung der IR-Spektren noch verbessert werden. Die Darstellung der ersten und zweiten Ableitung zusammen mit dem nicht modifizierten Spektrum ist am Beispiel des Haarmaterials HP-3 in Abbildung 37 gegeben.

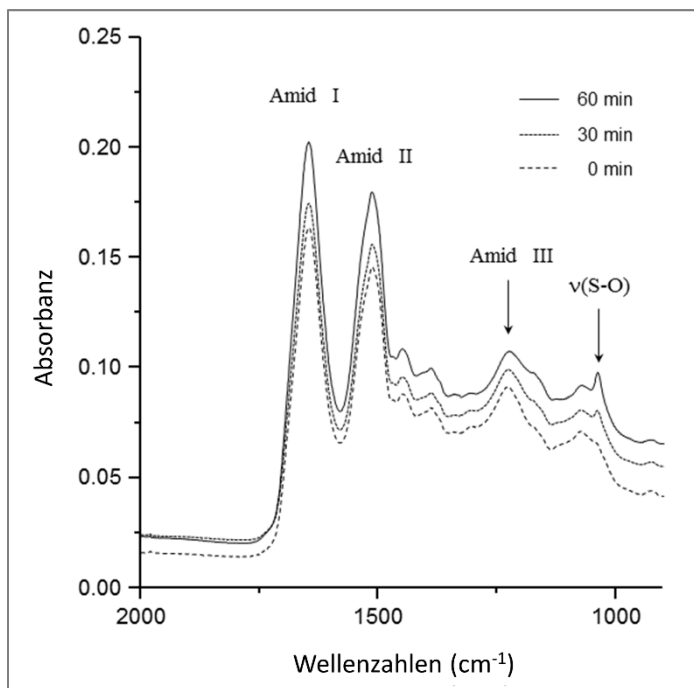


Abbildung 36: Absorptionsspektrum des Haarmaterials HP-3 ohne oxidative Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und nach Einwirkzeiten von 30 und 60 Minuten mit Bleichmittel B

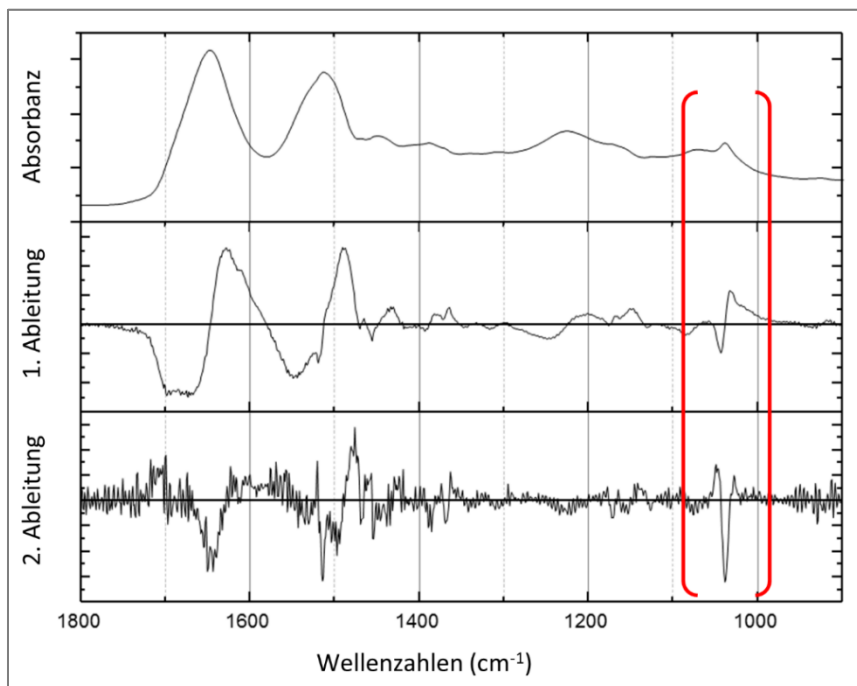


Abbildung 37: Absorptionsspektrum des Haarmaterials HP-3 mit erster und zweiter Ableitung

In Abbildung 37 erkennt man zwar bei  $1040\text{ cm}^{-1}$  (siehe rote Klammern) das Signal für Cysteinsäure, jedoch ist es nicht sehr stark ausgeprägt. Bildet man die erste Ableitung über das gesamte Spektrum, so erkennt man deutlich eine Kurve, die (v. l. n. r.) zuerst ins Negative ausschlägt, um danach positive Werte anzunehmen. Die Amplitude des Signals war stärker ausgeprägt als im Originalspektrum. Nach Bildung der zweiten Ableitung ergab sich ein Signal mit einem Hauptausschlag in Richtung negativer Werte. Die Amplitude war noch stärker ausgeprägt als beim einfach abgeleiteten Spektrum. Auf diese Weise konnte ein Bleichen sicher nachgewiesen werden. Durch die Prüfung auf Vorhandensein der S-

O-Bande bei  $1040\text{ cm}^{-1}$  war es folglich möglich, verlässlich den oxidativen Status einer möglicherweise modifizierten Haarprobe zu testen.

Vor Versuchsstart musste eine Kontrolle aller eingesetzten Haarmaterialien auf Abwesenheit der  $\nu(\text{S-O})$ -Bande erfolgen. Die Materialien HP-1 bis 3 und ESM-1-3, 5 und 7-13 wurden untersucht. Die Ergebnisse waren bis auf drei Materialien negativ: ESM-7, 10 und 12 zeigten eine schwache Bande bei  $1040\text{ cm}^{-1}$ , jedoch war diese deutlich weniger stark ausgeprägt als nach dem Bleichen mit Wasserstoffperoxidlösung. Die Literatur berichtete bereits über das Vorkommen kleinerer Mengen Cysteinsäure in unbehandeltem Haar [99, 166]. Es handelte sich um sog. Photobleaching, bei dem solare UV-Strahlung einen Oxidationsprozess im Haar induziert. Weiterhin ist bekannt, dass es keine Unterschiede im IR-Spektrum von Haaren hinsichtlich des Geschlechtes gibt [161, 167].

Durch das Vorhandensein minimaler Mengen von Cysteinsäure selbst in nicht gebleichtem Haar war es wichtig, einen Cut-off-Wert zu definieren, bei dem Haarproben bei Überschreitung als gebleicht eingestuft werden können. Zu diesem Zweck musste Cysteinsäure zumindest semi-quantitativ erfasst werden. Dazu diente die Höhe der Bande für Cysteinsäure ins Verhältnis gesetzt mit der Amid-I-Bande bei  $1640 - 1650\text{ cm}^{-1}$  [99, 100, 163, 167], der Amid-II-Bande bei  $1510 - 1515\text{ cm}^{-1}$  [167], der Amid-III-Bande bei  $1227\text{ cm}^{-1}$  [100, 168, 169] und der  $\text{CH}_2$ -Deformations-Schwingungsbande bei  $1445\text{ cm}^{-1}$  [168] nach Normierung der Spektren. In dieser Arbeit erfolgte die Normierung auf zwei Referenzpunkte: Das Absorptionsminimum zwischen Amid-I- und Amid-II-Bande ( $1580\text{ cm}^{-1}$ ) und dem Minimum bei  $903\text{ cm}^{-1}$ . Dies ist in Abbildung 38 verdeutlicht.

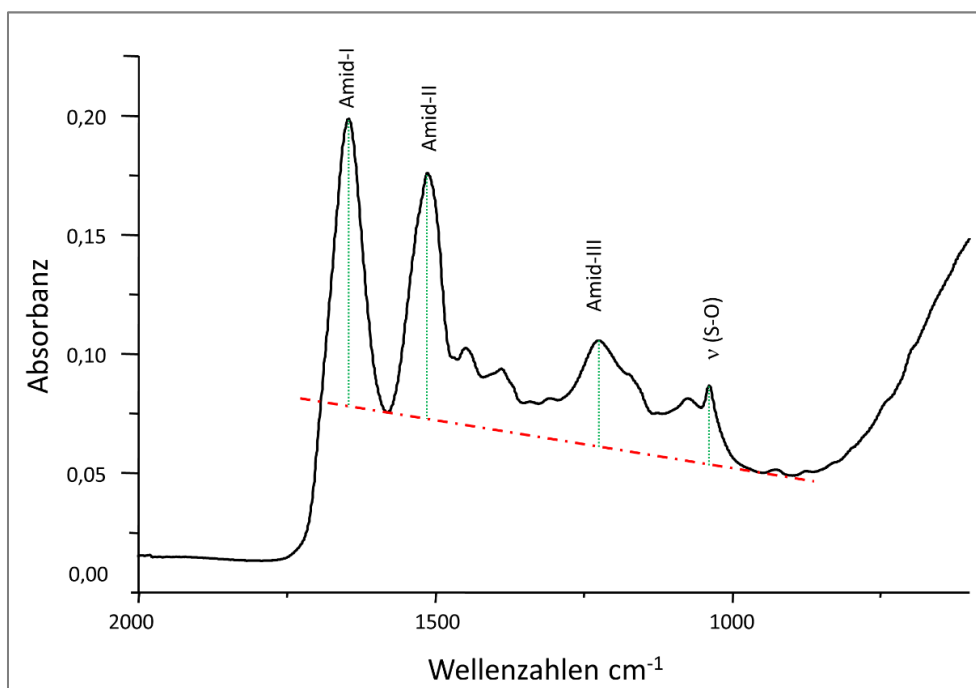


Abbildung 38: Auswertung von Signalhöhen durch Erstellung einer Referenzlinie FTIR, Haarmaterial HP-3

Wie Abbildung 39 und Tabelle 33 zeigen, war die Veränderung der Verhältnisse der Bandenhöhen bei  $\nu(\text{S-O})/\text{Amid-III}$  nach Bleichen am höchsten. In diesen Plot fanden alle in dieser Arbeit untersuchten Proben Einzug, d.h. 13 verschiedene Haarmaterialien, unbehandelt und nach Bleichen entweder mit Lösung A, B oder C zwischen 10 und 60 Minuten.

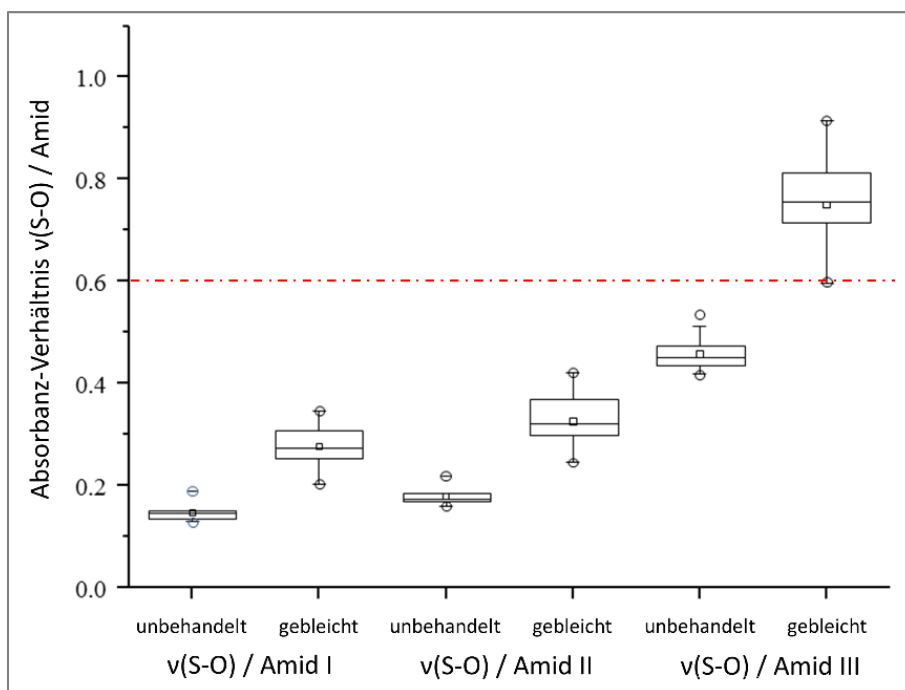


Abbildung 39: Box-Plot-Darstellung der Verhältnisse von v(S-O) zu verschiedenen Amid-Banden

Die wertmäßigen Verhältnisse sind in Tabelle 33 dargestellt.

Tabelle 33: Wertmäßige Verhältnisse der v (S-O)-Bande zu verschiedenen Amid-Banden

Bande	unbehandelt	behandelt
v (S-O) / Amid-I	0,14	0,28
v (S-O) / Amid-II	0,18	0,32
v (S-O) / Amid-III	0,44	0,70

Als Cut-off-Wert kann das Verhältnis von v (S-O) zu Amid-III (unbehandelt zu behandelt) mit einem Wert von 0,60 vorgeschlagen werden. Liegt das Verhältnis der Bandenhöhen darunter, lag die Probe wahrscheinlich in nicht gebleichter Form vor. Liegt sie darüber, so kommt ein Bleichen in Frage. Der Grenzwert stellt einen experimentellen Versuchswert auf Basis der in diesem Experiment gewonnenen Daten dar.

#### Abhängigkeit des EtG-Gehaltes in Haaren vom verwendeten Bleichmittel und der Einwirkzeit

Nachdem sichergestellt war, dass ein Bleichen zweifelsfrei detektiert werden konnte, sollte der Zusammenhang zwischen EtG-Verlust und Bleichmittel zusammen mit dessen Einwirkzeit bei Haarmaterialien mit unterschiedlichen EtG-Gehalten ermittelt werden.

Zum besseren Verständnis folgt eine Zusammenfassung über die Zusammensetzungen der Bleichmittel laut Kapitel 3.2.5.

Bleichmittel A:	10 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Reinwasser
Bleichmittel B:	10 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH = 8,3
Bleichmittel C:	10 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH = 10,0 eingestellt mit NH <sub>3</sub>

Die zu behandelnden Haarproben wurden zuvor mit Dichlormethan und Methanol gewaschen und getrocknet. Nach Behandlung (10 bis 60 Minuten) wurde das Bleichmittel entfernt und mit 3 × 1 mL Reinwasser gewaschen, um möglichst viel Bleichmittel zu entfernen und die Oxidationsreaktion zu stoppen. Nach Einfrieren der Proben erfolgte eine Lyophilisierung (Kapitel 3.2.4) über Nacht bis zur

Trockne der Haare. Die Proben wurden im Anschluss entweder der FTIR-Analytik zugeführt oder der EtG-Gehalt mit HPLC-MS/MS nach *Mikropulverisierung* bestimmt. Die tagesaktuellen Kalibrierungen erfolgten mit EtG-Standards zwischen 1 - 800 pg/mg und wiesen in jedem Fall ein Bestimmtheitsmaß  $\leq 0,998$  auf.

Beim Haarmaterial des ersten Experimentes, welches zur Evaluierung der nötigen und praktikablen Einwirkzeiten zum Abbau von EtG führte, handelte es sich um das Haarpoolmaterial HP-3. Zum einen lag der EtG-Gehalt mit  $22,4 \pm 1,0$  pg/mg noch im Bereich des sozialen Trinkens und spiegelte somit einen praktisch relevanten Gehalt an EtG wieder. Zum anderen war von diesem homogenen Material eine ausreichende Menge für mehrere Wiederholbestimmungen vorhanden.

Es sollte geklärt werden, in welchem Ausmaß die im Haar nachweisbare EtG-Menge oxidativ entfernt werden konnte und ob dadurch der EtG-Gehalt nach Bleichen einer niedrigeren Klassifizierung gemäß SoHT-Kriterien entsprach, also ein starkes Trinkverhalten nunmehr als soziales Trinken oder gar als Abstinenz eingestuft werden konnte. Im Folgenden ist das erste Experiment an Haarmaterial HP-3 gezeigt. Abweichend von der Vorgehensweise, Proben allein mit der *Mikropulverisierung* zu extrahieren, erfolgte bei der Evaluierung des Effektes von Bleichmittel A eine zweifache Extraktion. Dies kam durch Verwendung der bereits für die IR-Analytik eingesetzten trocken gemahlene Haarproben zustande. Diese konnten nach IR-Analytik vollständig in die EtG-Analytik überführt werden. An diesen bereits gemahlene Proben erfolgte zur Extraktion des EtG dann die *Mikropulverisierung*. Durch den vorangehenden Mahlschritt, waren die Extraktionsausbeuten für EtG aus dem Haarmaterial HP-3 minimal höher (s.u.). Die Kennzeichnung in Abbildung 40 lautete daher *2x gemahlen*. Es soll an dieser Stelle noch einmal herausgestellt werden, dass Haarproben im *geschnittenen* Zustand oxidiert wurden und erst dann entweder per Mikropulverisierung extrahiert und auf ihren EtG-Gehalt hin untersucht oder aber trocken gemahlen der FTIR-Analytik zugeführt wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit des Effektes erfolgte deshalb auch eine Extraktion von HP-3 unbehandelt durch trockenes Mahlen mit anschließender Mikropulverisierung.

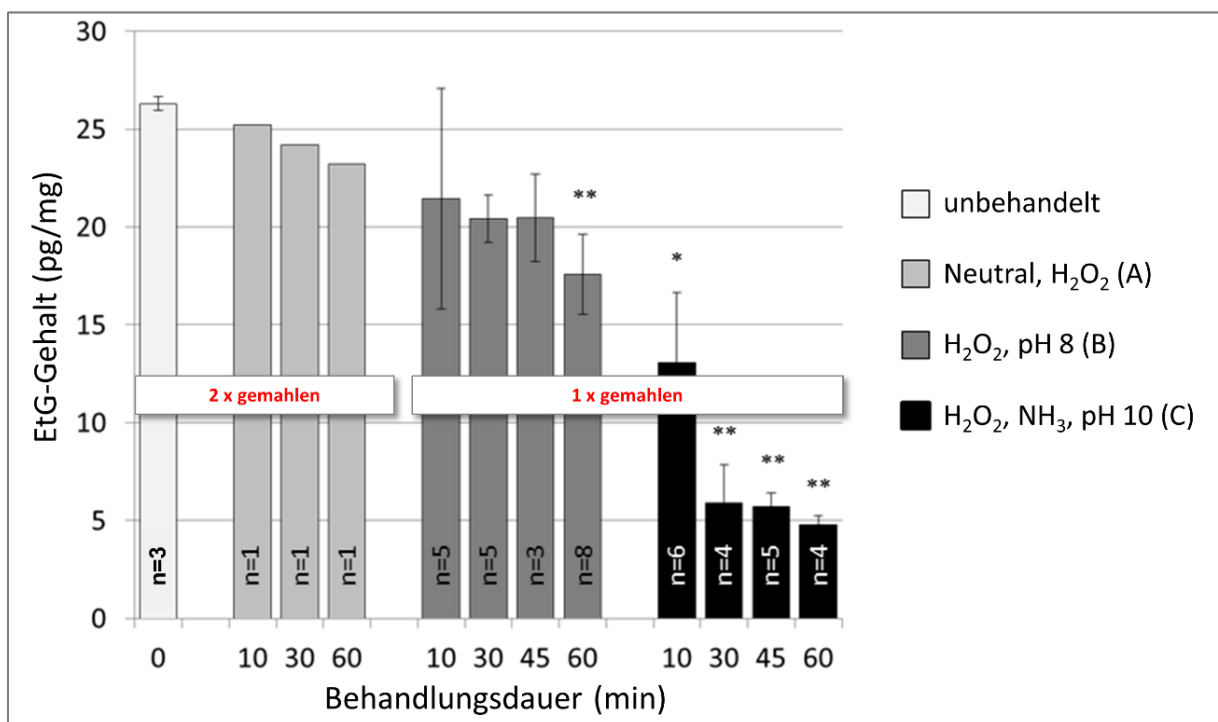


Abbildung 40: EtG-Gehalte des Materials HP-3 nach Behandlung mit den Bleichmitteln A, B oder C in Abhängigkeit der Einwirkzeit; HPLC-MS/MS; Signifikanz der Unterschiede zum unbehandelten Haar: Welch-Test, \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,01$

### HP-3: Bleichmittel A

Der Ausgangsgehalt für die doppelt gemahlene und später nur mit Bleichmittel A behandelten Proben lag bei  $26,3 \pm 0,3$  pg/mg EtG, also 3,9 pg/mg höher, als durch reine *Mikropulverisierung* erreichbar war. Nach 10 Minuten Einwirkzeit reduzierte sich dieser Wert auf 25,2 pg/mg, nach 30 Minuten auf 24,2 pg/mg und nach 60 Minuten auf 23,2 pg/mg. Die langsame Abnahme des EtG-Gehaltes legte die Vermutung nahe, dass reines Wasserstoffperoxid in wässriger Lösung ohne puffernde Zusätze nur geringen Einfluss auf die Extrahierbarkeit des EtGs hatte. Vielmehr musste angenommen werden, dass hauptsächlich die Extraktionszeit für eine teilweise Auswaschung des EtGs verantwortlich war. Nach diesen ersten Versuchen wurden HP-3-Haarproben mit einem alkalisch gepufferten Bleichmittel behandelt (Bleichmittel B).

### HP-3: Bleichmittel B

Bleichmittel B beinhaltete ebenfalls 10 % Wasserstoffperoxid, war allerdings mit 50 mM Tris-HCL-Lösung auf pH 8,3 gepuffert, also leicht in den basischen Bereich verschoben. Da ab diesem Versuch keine doppelte Mahlung mehr stattfand (siehe Bleichmittel A), konnte als Ausgangswert der Mittelwert der Homogenitätsstudie für HP-3 von  $22,4 \pm 1,0$  pg/mg angenommen werden. Nach 10-minütiger Einwirkzeit betrug das gemessene EtG-Level  $21,4 \pm 5,6$  pg/mg. Nach 30 Minuten  $20,9 \pm 1,1$  pg/mg, nach 45 Minuten  $20,5 \pm 2,2$  pg/mg und nach 60 Minuten schließlich  $17,6 \pm 2,1$  pg/mg. Erst nach einer Stunde ließen sich signifikante EtG-Verluste nachweisen (Welch-Test,  $p < 0,001$ ).

### HP-3: Bleichmittel C

Die Zusammensetzung des Bleichmittels C war analog zu Bleichmittel B, jedoch mit Ammoniak-Zusatz auf pH 10 eingestellt. Nach Wiederholung der Experimente mit Lösung C konnten bereits nach 10 Minuten signifikante Verluste an EtG nachgewiesen werden (Welch-Test,  $p < 0,01$ ). Der EtG-Gehalt betrug nur noch  $13,1 \pm 3,6$  pg/mg. Nach 30 Minuten lag der analysierte Wert bei  $5,9 \pm 2,0$ , nach 45 Minuten bei  $5,7 \pm 0,7$  und nach 60 Minuten bei  $4,8 \pm 0,4$  pg/mg (Welch-Test,  $p < 0,001$ ). Damit war es möglich, bei diesem Haar material durch Einwirkung einer basischen  $H_2O_2$ -Lösung ein abstinentes Trinkverhalten vorzutäuschen.

Dadurch wurde der Nachweis erbracht, dass alkalische Oxidation mit  $H_2O_2$ -Lösung den EtG-Gehalt im Haar verringern kann. Die Untersuchung weiterer Haar materialien sollte beweisen, dass der EtG-Gehalt manipulativ auf sehr niedrige Werte verringert werden konnte. Dazu wurden fünf unterschiedliche Materialien mit unterschiedlichen Gehalten ausgewählt:

ESM-1:	$82,9 \pm 12,3$	pg/mg	n = 4
ESM-3:	$4,2 \pm 1,1$	pg/mg	n = 13
ESM-4:	$567,5 \pm 32,8$	pg/mg	n = 3
ESM-5:	$621,6 \pm 709$	pg/mg	n = 9
ESM-8:	$70,1 \pm 15,1$	pg/mg	n = 22

Zum Einsatz kamen nur noch Lösung B und C, da Lösung A nachweislich keine wesentlichen Änderungen am EtG-Gehalt hervorrief.

Ebenso erfolgte eine Beschränkung des Zeitintervalls auf 45 Minuten. Dieses kam einerseits einem praktischen Bleichen bei kommerziellen Produkten nahe, zum anderen konnte an den Proben von HP-3 bereits gezeigt werden, dass zumindest bei Lösung C schon nach 30 Minuten die größte Zerstörung des EtGs abgeschlossen war. Statistische Beurteilungen erfolgten mit Hilfe des Welch-Testes.

Abbildung 41 zeigt den EtG-Gehalt der Haarproben in Abhängigkeit der verwendeten Lösung. Der erste Balken (hellgrau) stellt jeweils den Ausgangswert nach Homogenitätsuntersuchung dar.



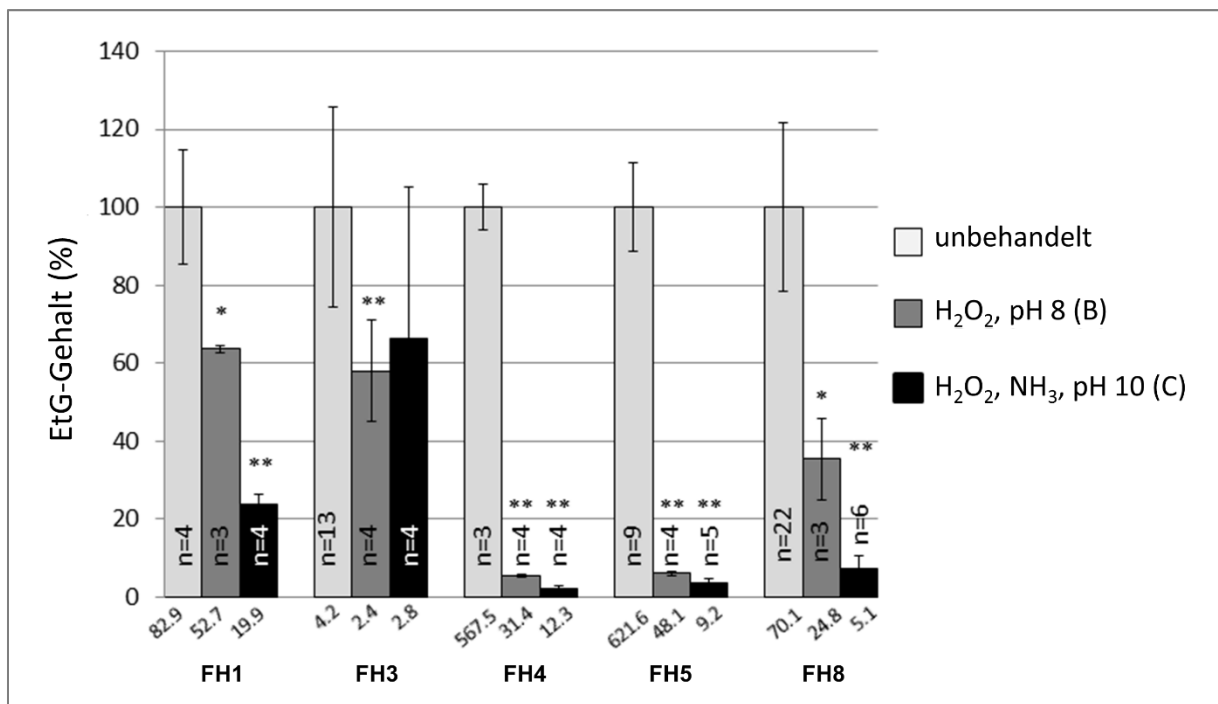


Abbildung 41: Prozentuale EtG-Gehalte nach Bleichen mit Bleichlösung B und C nach 45 Minuten HPLC-MS/MS; n = Anzahl Wiederholversuche; \* p < 0,05; \*\* p < 0,001 (Welch-Test)

Hellgrau: Ausgangswert der unbehandelten Haare (%); dunkelgrau: prozentualer EtG-Gehalt nach Bleichen mit Lösung B; schwarz: prozentualer EtG-Gehalt nach Bleichen mit Lösung C; Werte unter den Balken: tatsächlich gemessener EtG-Gehalt (pg/mg)

#### ESM-1

Der Ausgangsgehalt von  $82,9 \pm 12,3$  pg/mg wurde nach 45 Minuten mit Lösung B auf  $52,7 \pm 0,7$  und mit Lösung C auf  $19,9 \pm 2,0$  pg/mg EtG reduziert. Das entsprach einer Reduktion auf 63,5 pg/mg respektive 24,0 %. Mit Bleichmittel C war es möglich, eine Haarprobe, die auf chronisch exzessiven Alkoholkonsum hinweist, in den Bereich des sozialverträglichen Trinkens (< 30 pg/mg) zu bringen.

#### ESM-3

Der Referenzgehalt nach 13 Wiederholungsmessungen lautete  $4,2 \pm 1,1$  pg/mg. Die hohe relative Standardabweichung (25,6 %) kann auf die Quantifizierung nahe dem LOQ zurückgeführt werden. Dieser Wert lag bereits vor dem Bleichen im Abstinenzbereich. Mit Hilfe der Bleichmittel B und C war es möglich, den EtG-Gehalt auf  $2,4 \pm 0,5$  und  $2,8 \pm 1,6$  pg/mg zu reduzieren. Auffällig ist der höhere Wert bei Lösung C. Erfahrungsgemäß zerstört Lösung C mehr EtG als Lösung B. Betrachtet man die Standardabweichung der beiden Messserien, so erkennt man eine deutlich stärkere Schwankung der Messwerte im Fall von Lösung C, als bei Lösung B. Dies führte auch dazu, dass die Messergebnisse dieser Proben sich statistisch nicht von denen der Homogenitätsmessung und somit des Ausgangswertes von 4,2 pg/mg unterschieden. Es war nicht möglich, mit Hilfe der Bleichmittel den EtG-Wert unter das Detektionslimit zu senken.

#### ESM-4

Mit initial  $567,5 \pm 32,8$  pg/mg handelte es sich bei diesem Haarmaterial um die Probe eines starken Trinkers. Nach Behandlung mit Bleichmittel B lag der EtG-Gehalt bei  $31,4 \pm 2,4$  pg/mg und nach Behandlung mit Bleichmittel C bei  $12,3 \pm 5,1$  pg/mg. Das entsprach 5,5 bzw. 2,0 % des ursprünglichen EtG-Gehalts. Betrachtet man die absoluten Werte, handelt es sich um eine drastische Reduktion. Nach Applikation von Lösung B war der Gehalt der Probe fast im sozialen Bereich angesiedelt, nach Lösung C sogar fast in dem der Abstinenz.

## ESM-5

Auch hier handelte es sich um eine Probe eines starken Alkoholikers. Mit  $621,6 \pm 70,9$  pg/mg war es die am höchsten konzentrierte Probe in diesem Experiment. Mit Lösung B konnte der EtG-Gehalt auf  $48,1 \pm 4,3$  pg/mg (7,7 %) und mit Lösung C auf  $9,2 \pm 2,6$  pg/mg (1,5 %) gesenkt werden, also einen Wert nahe der Cut-offs zum abstinenten Trinkverhalten. Obwohl die Ausgangskonzentration sogar höher war, als bei ESM-4, konnte mit Lösung C mehr EtG „unsichtbar“ gemacht werden.

## ESM-8

Bei ESM-8 handelte es sich um die anonymisiert gespendeten Haare eines Jungen (11 Jahre alt). Erste Analysen brachten Werte um 60 pg/mg zutage, weshalb die Entscheidung fiel, eine größere Messserie zu starten, um Analysenfehler auszuschließen. Tatsächlich konnte nach 22 Wiederholungen ein EtG-Level von  $70,1$  pg/mg  $\pm 15,1$  festgestellt werden.

Auf ein sozial akzeptables Maß konnte der EtG-Gehalt mit Lösung B reduziert werden ( $24,8 \pm 7,3$  pg/mg; RSD = 35,3 %) und mit Lösung C auf einen Wert, der abstinentes Verhalten vortäuschte ( $5,1 \pm 2,3$  pg/mg; RSD = 7,1 %). Es war somit möglich, mit geringem Aufwand und leicht verfügbaren Substanzen, EtG-Proben von teilweise sehr hohen EtG-Gehalten so stark zu modifizieren, dass sie sozialverträgliche Ergebnisse liefern, bzw. sogar abstinentes Verhalten vortäuschen. Eine bemerkenswerte Beobachtung sei in Abbildung 42 dargestellt:



ESM-5, unbehandelt

ESM-5, 45 min, 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 8

ESM-5, 45 min, 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 10

Abbildung 42: Optisches Erscheinungsbild dreier Haarproben vor und nach Behandlung mit Bleichmitteln A-C

Von allen verwendeten Lösungen im Experiment führte ausschließlich Lösung C zu sichtbaren Bleicheffekten. Gezeigt wurde das am Beispiel des Materials ESM-5, welches unbehandelt nach 45-minütiger Behandlung mit Lösung B und nach 45-minütiger Behandlung mit Lösung C abgebildet wurde. Rein optisch war eine Manipulation nur im Falle der Behandlung mit Lösung C erkennbar. Dennoch zeigte die FTIR-Analytik bereits positive Ergebnisse, selbst wenn noch keine optische Aufhellung zu sehen war oder überhaupt EtG zerstört wurde.

Soll eine Haarprobe unrechtmäßig manipuliert werden, wäre es denkbar nach oxidativer Behandlung das erblondete Haar wieder braun einzufärben. Durch eine bloße Betrachtung kann dieser Sachverhalt niemals aufgedeckt werden. Naturblondem oder grauem Haar würde man eine oxidative Behandlung wahrscheinlich auch ohne späteres Färben nicht ansehen.

Die entwickelte FTIR-Methode ist jedoch eindeutig in der Lage, manipuliertes Material mit einem minimalen Probenaufwand zerstörungsfrei zu identifizieren. Gerade vor forensischem Hintergrund ist eine Wiederverwendbarkeit der Probenaliquote von großer Bedeutung, da oft keine großen Probenmengen verfügbar sind. Dabei spricht der Assay sogar schon auf oxidative Einflüsse an, welche noch keine nennenswerten Auswirkungen auf den EtG-Gehalt haben (vergleiche dazu auch Bleichmittel A). Der FTIR-Versuch ist auch im Nachhinein verwendbar: Bereits extrahiertes Haarmaterial lässt sich trocken pulverisieren und dann mittels FTIR auf Cysteinsäure hin untersuchen.

## 4.4 Einlagerung von EtG und weiteren Glucuroniden ins Haar

### 4.4.1 Selbstversuche am Modell Barthaar

Das folgende Kapitel verwendet das Modellsystem *Barthaar* anstatt Skalthaar. Der Vorteil gegenüber Kopfharen bestand in der bei Männern durch Rasur sehr schnell verfügbaren Haarproben, v.A. wenn es um die Beobachtung von Transformations- und Einlagerungseffekten aus Blut, Schweiß oder Sebum in das wachsende Haar ging.

Der Abschnitt teilt sich zum einen thematisch in die Beobachtung der Einlagerung von EtG ins Barthaar, zum anderen in die Beobachtung der Einlagerung anderer Glucuronide (Kap. 4.3.2) nach Konsum der Muttersubstanzen. Am Versuch zur Einlagerung des EtGs nach Konsum dokumentierter Alkoholmengen nahmen drei freiwillige Probanden teil, um mögliche Unterschiede zwischen den Versuchspersonen festzustellen. Speziell bei den nicht-EtG-Glucuroniden lag das Hauptaugenmerk auf den potentiell am wahrscheinlichsten detektierbaren Substanzen wie z.B. Cotinin-N-Glucuronid bei Rauchern oder Paracetamol-Glucuronid und Acetylsalicylsäure-acyl-Glucuronid bei Schmerzpatienten. Darüber hinaus konnte auf Grund eines kurzfristig nötigen Klinikaufenthaltes auch das Glucuronid von Propofol, einem Injektionsnarkotikum, in Barthaaren nachgewiesen werden.

### 4.4.2 Einlagerungsverhalten von EtG ins Barthaar

Die Aufnahme von Ethanol führt zur Einlagerung des gebildeten EtG in Skalthaar, aber auch in Haare an anderen Körperregionen [8, 15-19, 63, 67, 69-71]. Darüber hinaus sind andere keratinisierte Matrices wie Nägel ebenso von Einlagerungserscheinungen betroffen [170-173]. Während sich diese Matrices eher zur Langzeitbestimmung von EtG über einen Zeitraum von drei bis sechs Monaten eignen [48], kann durch Nachweis von EtG im Urin auch ein kurzfristiger Alkoholkonsum nachgewiesen werden. Die Konzentrationen sind im Urin ungleich höher als in Haaren [42-45].

Im vorliegenden Experiment wurde EtG im Barthaar dreier Freiwilliger nach Alkoholkonsum quantifiziert. Dabei erfolgte die genaue Dokumentation der während des Experimentes aufgenommenen Ethanolmenge bei allen drei Probanden. Nach Alkoholkonsum erfolgte eine ebenfalls genau dokumentierte Depletionsphase, in der die Probanden abstinent waren. Das Experiment kann daher als Erweiterung zu einem ähnlich aufgebauten Versuch von Schröder et al. [17] angesehen werden, bei dem allerdings nur eine einzelne Ethanoldosis konsumiert wurde. Diese Publikation zeigte, dass das Auftreten von EtG im Barthaar einer zeitlichen Verzögerung unterlag. So wurden maximale EtG-Gehalte erst in den Bartabschnitten zwei bis drei Tage nach einem Trinkereignis dokumentiert. Kronstrand et al. [33] fand bei Probanden, welche tägliche Alkoholdosen von 32 g über drei Monate zu sich nahmen, deutlich geringere EtG-Gehalte im proximalen Zwei-Zentimetersegment als 30 pg/mg. In der vorliegenden Arbeit führte jeder Proband mehrere Wiederholungen von Trinkereignis und abstinenter Phase durch.

Barthaare wurden tagesaktuell mit einem Trockenrasierer entfernt und bis zur Analyse in Aluminiumfolie eingeschlagen (*Probanden 1* und *2*) bzw. in 2-mL-Eppendorf-Gefäßen aus Kunststoff (*Proband 3*) bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zur Sicherstellung einer ausreichenden Probenmenge zur Analytik wurden Einzelproben separat genau gewogen und bei Bedarf (Einzelmasse < 20 mg) gepoolt. Dabei wurde ein Kompromiss zwischen zeitlicher Auflösung und einer Probenmenge möglichst nahe an 20 mg gewählt.

Die Extraktion erfolgte mittels *Mikropulverisierung*, gewaschen wurden die Barthaarproben in diesem Experiment generell nicht, da durch die Trockenrasur zum Teil sehr kleine Haarpartikel entstanden und diese möglicherweise durch die Waschung entfernt worden wären. Für die Analytik der Proben wurde die HPLC-MS/MS eingesetzt.

#### Proband 1

Bei *Proband 1* handelt es sich um die Versuchsperson mit der höchsten Menge an konsumierten Einzeldosen an Alkohol, gleichzeitig aber auch um diejenige mit der geringsten Menge an täglichem Barthaarabschnitt. Auch unterlag diese Menge einer starken Schwankung. So reichte die tägliche

Probenmenge von 1,5 bis 22,5 mg. Der Versuch wurde im Zeitraum vom 28.06.2013 bis zum 13.08.2013 durchgeführt. In Tabelle 34 sind die tagesaktuellen Einwaagen der Barthaarproben sowie die resultierenden Pools aufgelistet. Einige Proben wurden gezielt verworfen und gingen nicht in die Analytik mit ein: Es handelte sich um Barthaarproben, welche am Tage eines Trinkereignisses gewonnen wurden. Würde man diese Proben mit weiteren Proben nach einem Trinkereignis poolen, so träten unweigerlich Verdünnungseffekte auf.

Tabelle 34: Einwaage der Haarproben und resultierendes Pooling bei *Proband 1*  
Fett gedruckte Werte: Proben nicht analysiert, da Trinkereignis an diesem Tag

Einzeleinwaagen [mg]	Summe [mg]
11,0; 7,2; 14,5; 4,8	37,5
12,7; 6,3; 15,9	34,9
15,3; 9,2; 15,4	39,9
5,7; 5,7; 11,0	22,4
17,8; <b>15,3<sup>*1</sup></b> ; 9,4	27,2
10,6; 9,4; 8,8	28,8
7,4; 22,5; 3,3; 6,5	33,2
10,2; 9,9	20,1
1,5; 5,1; 5,7; 3,3; 6,1	21,7
4,0; 16,1; 6,4	26,5
17,2; 8,9; 15,0	41,1
<b>12,7<sup>*2</sup></b>	n.a.
10,9; 11,8; 3,3	26,0
8,7; 5,4; 4,7	18,8
12,7; 14,8; 4,1; 8,7	40,5
<b>7,7<sup>*3</sup></b>	n.a.
8,1; 3,8; 5,1; 2,6	19,6
10,0; 10,6; 5,1	25,7

Einwaagen vom <sup>\*1</sup> 12.07.2013, <sup>\*2</sup> 03.08.2013, <sup>\*3</sup> 14.08.2013

Im betrachteten Zeitraum lagen fünf Trinkereignisse. Drei davon waren isolierte Ereignisse und bei zweien wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen Alkohol konsumiert. Die alkoholischen Getränke waren: Bier, Rotwein, Likör und Weinbrand. Der Massenanteil des Alkohols in den Getränken errechnete sich nach unten angegebener Formel. Dabei galt: m = Masse Ethanol;  $\varphi$  = Volumenanteil Ethanol;  $\rho$  = Dichte Ethanol (0,789 g/mL)

$$m = V_{\text{GETRÄNK}} (\text{mL}) * \varphi * \rho_{\text{ETHANOL}} (\text{g/mL})$$

Die aufgenommenen Alkoholmengen betrugen (gegliedert nach Trinkereignis):

(1)	01.07.2013:	50 g
(2)	13.07.2013:	114 g
(3)	27.07.2013:	87 g
(4)	02.08.2013:	2 g
	03.08.2013:	75 g
(5)	13.08.2013:	32 g
	14.08.2013:	87 g

Die Abbildung 43 zeigt die nachgewiesene EtG-Menge in zeitlicher Abhängigkeit zur Alkoholaufnahme. Orange: Alkoholaufnahme in Gramm, die Balkenbreite entspricht der Dauer eines Tages; Grau: EtG-Gehalt in pg/mg der Barthaarproben. Die Breite der Balken korreliert mit der Menge der gepoolten Proben.

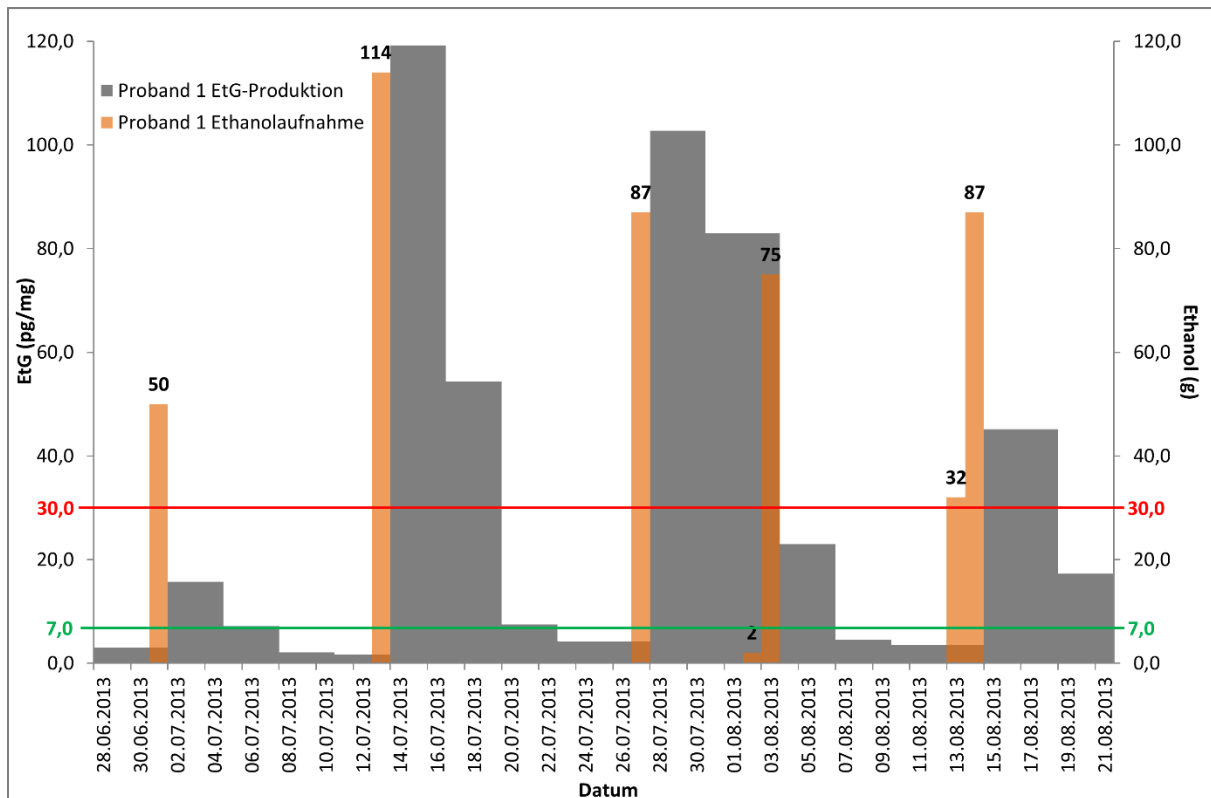


Abbildung 43: Konsumierte Alkoholmengen und erreichte EtG-Konzentrationen im Barthaar von *Proband 1*

Trinkereignis (1) führte nach Konsum von 50 g Alkohol zu einem maximalen EtG-Gehalt von 15,7 pg/mg im gepoolten Haar der Tage 1 bis 3 nach Trinkereignis. Bereits 4 bis 6 Tage nach Trinkereignis sank der Wert auf 7,1 pg/mg. Nach weiteren drei Tagen lag der EtG-Gehalt nur noch bei 2,1 und nach weiteren drei Tagen bei 1,7 pg/mg. Es war gut zu erkennen, dass ähnlich den Beobachtungen von Schröder et al. [17] ein maximaler EtG-Gehalt innerhalb von drei Tagen auftrat, welcher innerhalb weniger Tage wieder Werte nahe der Bestimmungsgrenze annahm.

Trinkereignis (2) umfasste 114 g Alkoholaufnahme. Die maximalen EtG-Werte lagen an Tag 1 bis 3 nach Trunk bei 119,2 pg/mg. Während der nächsten drei Tage halbierte sich der EtG-Gehalt auf 54,4 pg/mg um weitere drei Tage danach nur noch bei 7,5 pg/mg zu liegen. Der EtG-Gehalt des Pools 9 Tage nach Trinkereignis (2) wurde auf 4,2 pg/mg bestimmt.

Beim dritten Trunk wurden 87 g Ethanol aufgenommen, resultierend in einem maximalen EtG-Gehalt in der gepoolten Probe der Tage 1 bis 3 nach Trunk von 102,7 pg/mg. An den Tagen vier bis sieben nach dem Trunk fiel der Wert auf 83,0 pg/mg, dann auf 23,0 pg/mg (Pooling: 3 Tage), 4,6 pg/mg (Pooling: 3 Tage) und 3,6 pg/mg (Pooling: 5 Tage). Interessanterweise schienen das Trinkereignis (4) am 02.08. und 03.08.13 mit zwei und 75 Gramm Alkoholaufnahme keinen nennenswerten Einfluss auf den EtG-Gehalt der Proben gehabt zu haben: Es lag in der Zeit, zu der Werte mit 83,0 pg/mg registriert wurden. Da es sich um eine ähnliche Menge an Alkohol handelte wie bei Ereignis (3), erwartete man auch dort einen deutlich höheren EtG-Gehalt in den folgenden Tagen. Dies war nicht der Fall. Scheinbar führen konstante Mengen Alkohol nicht unbedingt zu konstanten Mengen an EtG im Barthaar derselben Person.

Im Falle von Trinkereignis (5) wurde dies klar: Es wurden 32 g Ethanol am 13.08. und 87 g Ethanol am 14.08.13 konsumiert. Kumuliert entsprach diese Menge von 119 g Ethanol in etwa der Menge an Alkohol von Trinkereignis (2) mit 114 g Aufnahme. Die maximalen EtG-Werte an Tag 1 bis 4 nach Trunk lagen jedoch nur bei 45,2 pg/mg verglichen mit 119,2 pg/mg nach Trunk (2). Das entsprach etwa nur einem Drittel des zuvor erhaltenen Wertes.

Zu *Proband 1* lässt sich abschließend sagen, dass jedes Trinkereignis zu EtG-Gehalten im gepoolten Haar größer als der Cut-off-Wert für abstinentes Verhalten (7 pg/mg) führte. Außer beim ersten Trinkereignis führten die konsumierten Alkoholmengen zu EtG-Gehalten über dem Cut-off für sozialverträgliches Trinken (> 30 pg/mg).

Diese Cut-offs lassen sich nicht ohne Weiteres auf tagesaktuelle Bartabschnitte übertragen, da normalerweise Kopfhair in Längen von drei bis sechs Zentimetern verwendet wird. Dennoch ist interessant, dass einmaliger Alkoholkonsum schnell zu hohen EtG-Gehalten im Barthaar führte, die i.d.R. in Zeiträumen von 7 bis 10 Tagen nach dem Trunk wieder auf das Niveau eines Abstinenzlers fielen.

## **Proband 2**

Bei *Proband 2* wurden drei Ereignisse im Abstand von zwei bis drei Wochen durchgeführt im Zeitraum vom 13.09.2013 bis 09.11.2013. Das konsumierte alkoholische Getränk blieb dabei immer das gleiche: Weizenbier mit einem Alkoholgehalt von 5,5 % (V/V). Bei Trinkereignis (1) wurden 0,5 L, entsprechend 22 g Ethanol konsumiert. Beim zweiten waren es 1,0 L, entsprechend 43 g Ethanol und beim dritten 1,5 L, entsprechend 65 g Ethanol.

Da täglich etwa 30 - 40 mg Material anfielen, war es möglich, täglich eine Barthaarprobe zu analysieren. Somit lagen bei *Proband 2* täglich Analysenergebnisse vor. Ausnahmen, bei denen doch gepoolt wurde, sind darin begründet, dass bei der Übermittlung der Proben Abschnitte mehrerer Tage in einem Aluminiumfoliebriefchen verpackt waren. So geschehen an folgenden Tagen:

13. – 15.09.2013  
16. – 17.09.2013  
22. – 23.09.2013  
24. – 25.09.2013  
05. – 06.10.2013  
11. – 12.10.2013  
13. – 15.10.2013  
26. – 27.10.2013  
29. – 31.10.2013  
02. – 04.11.2013  
05. – 06.11.2013  
07. – 08.11.2013

Die Trinkereignisse fanden an folgenden Daten statt:

(1)	17.09.2013:	22 g
(2)	04.10.2013:	43 g
(3)	26.10.2013:	65 g

Bei *Proband 2* konnte aufgrund der täglichen Probennahme gezeigt werden, dass immer am dritten Tage nach dem Trinkereignis ein Maximum im EtG-Gehalt zu verzeichnen war (Abbildung 44). Trinkereignis (1) führte nach Konsum von 22 g Ethanol zu einer maximalen EtG-Menge von 9,9 pg/mg an Tag drei. Diese fiel am Tag vier auf 8,4 pg/mg ab und war ab Tag 5 unter dem Cut-off für abstinentes Verhalten (3,5 pg/mg und weniger). Werte, welche mit 0 pg/mg dargestellt sind, lagen unter dem LOD. Trinkereignis (2) führte mit einer doppelt so hohen Aufnahme von 43 g Ethanol im Vergleich zu Trunk 1 zu einer doppelt so hohen EtG-Menge im Barthaar an Tag drei nach Trunk. Es wurden 20,6 pg/mg detektiert. In den folgenden Tagen fiel der EtG-Wert sukzessive ab auf 19,1 pg/mg an Tag vier, 13,5 pg/mg an Tag fünf und 4,5 pg/mg und weniger ab Tag sechs. In diesem Experiment dauerte es einen Tag länger, bis EtG-Werte unter Abstinenz-Niveau erreicht wurden.

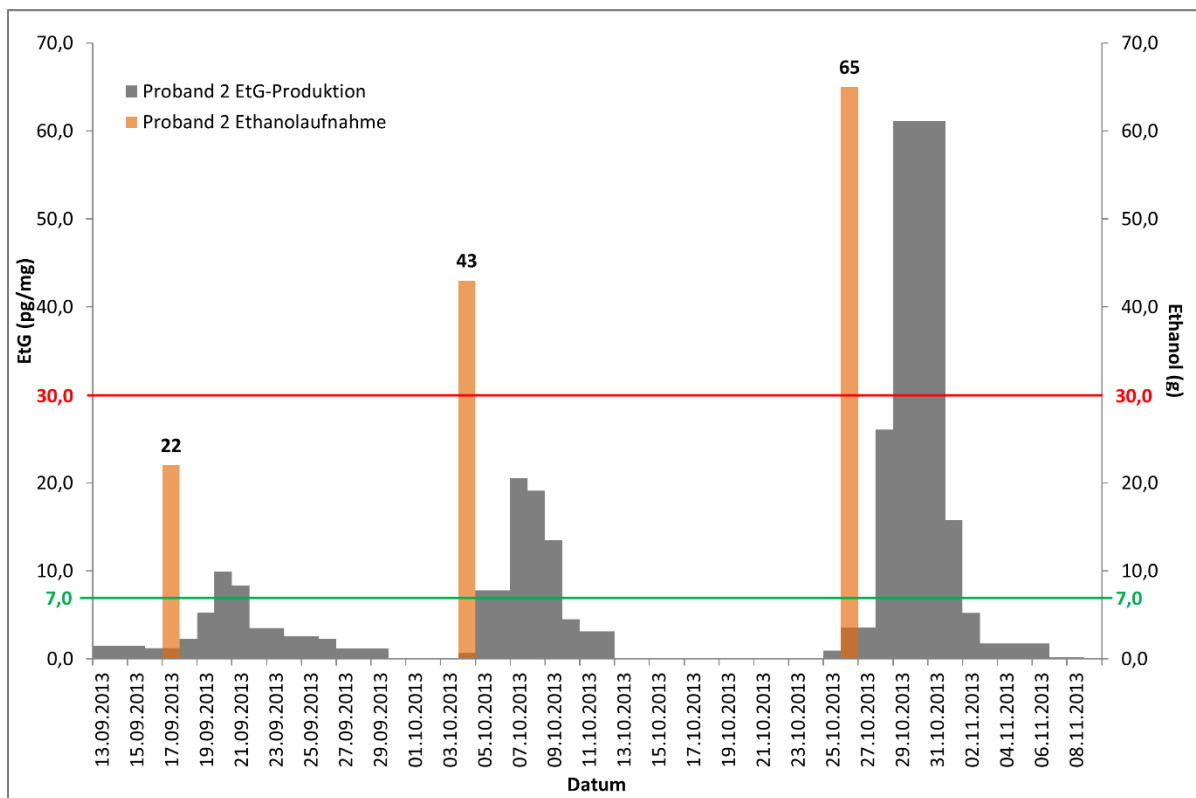


Abbildung 44: Konsumierte Alkoholmengen und erreichte EtG-Konzentrationen im Barthaar von *Proband 2*

Bei Trinkereignis (3) wurden 65 g Ethanol konsumiert. Da die Ethanolmenge linear gesteigert wurde, lag die Erwartung bei einem ebenso linearen Anstieg des EtG-Gehaltes im Barthaar an Tag drei, jedoch ähnlich wie bei *Proband 1* schienen die resultierenden EtG-Mengen nur lose mit der aufgenommenen Alkoholmenge zusammenzuhängen. Besagte Alkoholmenge führte nicht, wie erwartet zu EtG-Werten um die 30 pg/mg, sondern zu einem Wert, der überproportional höher war, nämlich 61,1 pg/mg. Dieses Ergebnis entstammt einer oben beschriebenen gepoolten Probe und umfasst somit die Tage drei bis fünf nach dem Trinkereignis. An Tag sechs war der EtG-Gehalt wieder unter der Marke für chronisch exzessiven Alkoholkonsum (15,8 pg/mg) und an Tag sieben unter dem Cut-off für abstinentes Verhalten (5,2 pg/mg).

Je höher die konsumierte Menge an Alkohol war, desto länger dauerte es auch, bis der EtG-Gehalt in den Bartabschnitten unter den Cut-Off für abstinentes Verhalten (7 pg/mg) fiel.

### Proband 3

Bei Proband 3 fanden vier Trinkereignisse im Zeitraum vom 29.12.2013 bis 04.01.2015 mit längeren Unterbrechungen zwischen den einzelnen Ereignissen statt. Barthaare in diesen Pausen wurden nicht auf EtG hin analysiert, da kein Alkohol konsumiert wurde. Vor jedem erneuten Trunk gesammelte Barthaare unterlagen einer Kontrollanalyse, um die Abwesenheit von EtG nachzuweisen.

Auch hier wurden Barthaare aus dem gleichen Grund wie bei Proband 2 gepoolt. So geschehen am:

29. – 30.12.2013  
01. – 02.01.2014  
03. – 05.01.2014  
06. – 07.01.2014  
05. – 06.04.2014  
08. – 09.04.2014  
02. – 03.12.2014  
04. – 05.12.2014  
02. – 04.01.2015  
05. – 06.01.2015  
07. – 08.01.2015  
11. – 12.01.2015  
17. – 19.01.2015

Die Trinkereignisse fanden an folgenden Tagen statt:

(1)	01.01.2014:	17 g
(2)	04.04.2014:	20 g
(3)	30.11.2014:	18 g
(4)	01.01.2015	31 g

Trinkerereignis (1) von 17 g Alkohol führte zu keinem nennenswerten EtG-Gehalt im Barthaar. Zwar existierten Messwerte um dieses Ereignis herum, jedoch sind diese nicht höher als 1,4 pg/mg. Sie konnten daher, schon allein wegen der Nähe zum LOD als „Grundrauschen“ interpretiert werden. Balken mit 0 pg/mg (Abbildung 45) waren unter dem LOD oder es war keine Probe von diesem Tag vorhanden.

Trinkereignis (2) führte nach 20 g Alkoholkonsum zu einem Maximalwert an EtG von 2,2 pg/mg an Tag eins nach dem Trunk, dieser fiel innerhalb von vier weiteren Tagen auf 0,9 pg/mg ab. Dieses Ergebnis war unerwartet. *Proband 2* produzierte mit dieser Menge Alkohol immerhin etwa 10 pg/mg nachweisbares EtG im Barthaar.

Bei Trinkereignis (3) mit einer ebenso vergleichbaren Menge aufgenommenen Ethanol von 18 g konnten immerhin 4,2 pg/mg EtG an Tag zwei nach Trinkereignis nachgewiesen werden. Dennoch war dieses Analysenergebnis immer noch weniger, als bei *Proband 2* mit vergleichbarer Ethanolmenge. Innerhalb weiterer fünf Tage sank der EtG-Gehalt auf 0,8 pg/mg.



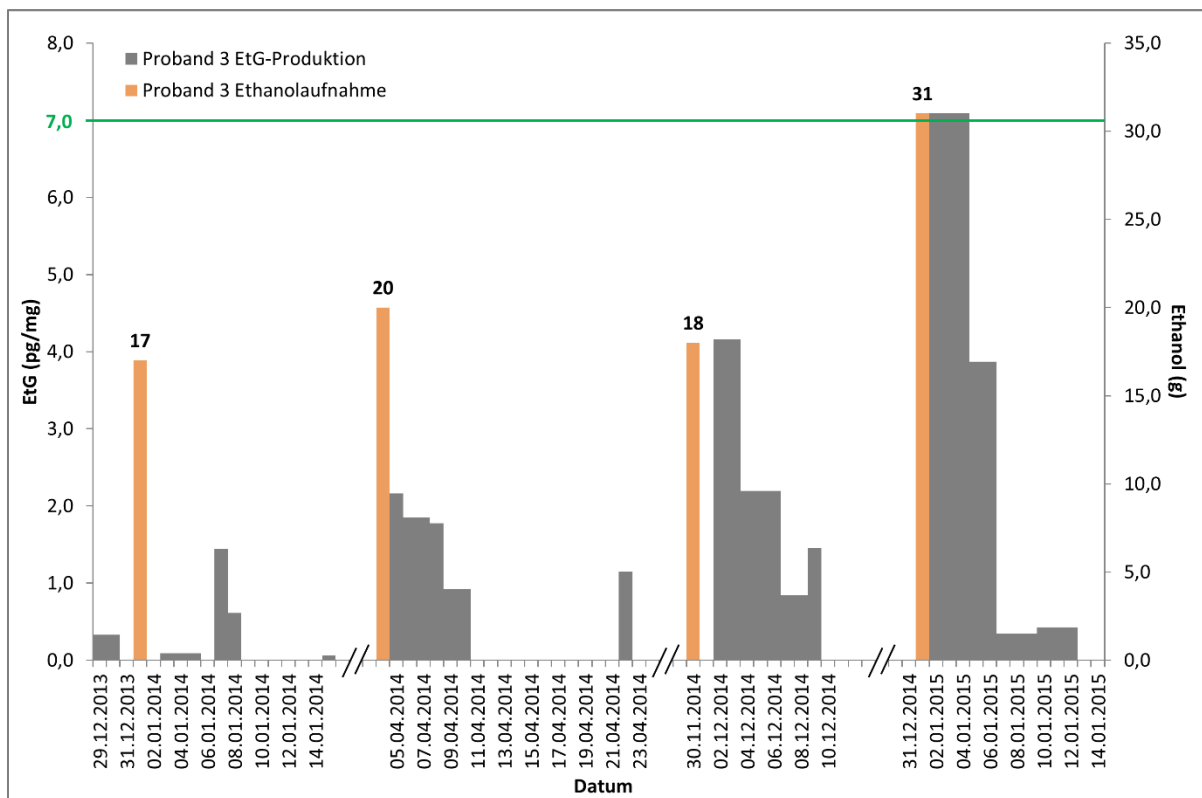


Abbildung 45: Konsumierte Alkoholmengen und erreichte EtG-Konzentrationen im Barthaar von *Proband 3*

Trinkereignis (4) beinhaltete 31 g konsumierten Alkohol. In einer gepoolten Probe, die den ersten drei Tagen nach dem Trunk entsprach, konnte ein EtG-Gehalt von 7,1 pg nachgewiesen werden. Das war der höchste gemessene Messwert für EtG bei diesem Probanden. An Tag vier und fünf konnten in einer gepoolten Probe nur noch 3,9 pg/mg und danach 0,3 pg/mg festgestellt werden. Bis auf den Messwert direkt nach dem vierten Trinkereignis bewegten sich alle Werte unter der sieben-Pikogramm-Marke. Verglichen mit den *Probanden 1* und *2* war die EtG-Produktion bzw. die Einlagerung desselben ins Barthaar viel weniger stark ausgeprägt.

Abschließend können zum Experiment *Trinkversuche* folgende Aussagen getroffen werden:

- EtG wird bereits am ersten Tag nach Alkoholkonsum ins Barthaar eingelagert.
- Der maximale EtG-Messwert wird i.d.R. etwa 2-3 Tage nach dem Konsum des Alkohols registriert.
- Die maximalen Werte sind oft über der Marke für chronisch exzessiven Alkoholkonsum.
- Eine Klassifikation nach SoHT in Abstinenz, wiederholtes Trinken und exzessives Trinken ist möglich, jedoch nicht sinnvoll. Es handelt sich bei diesem Experiment um Momentaufnahmen; EtG ist aber ein Langzeitmarker.
- Innerhalb einiger weniger Tage kehrt der EtG-Wert in den Barthaaren unter die Abstinenzmarke zurück.
- Gleiche Mengen Ethanol führen nicht zwangsläufig zu gleichen EtG-Messwerten im Barthaar. Eine Arbeit von Kronstrand et al. [33] zeigte, dass tägliche Alkoholaufnahmen von 32 g bei Männern über drei Monate nicht zu EtG-Gehalten im Skhalphaar führten, welche vermehrtes Trinken nahelegen würden (> 30 pg/mg). Die zugeführte Alkoholmenge entsprach etwa zwei Gläsern Rotwein (13,5 % V/V). Diese Aussagen konnten durch das hier vorliegende Experiment bestätigt und auf die Matrix Barthaar übertragen werden.
- EtG wird nicht in proportionalen Mengen zur Alkoholaufnahme gebildet oder eingelagert.

- Es gibt z.T. deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden, die erhaltenen EtG-Werte sind nicht Individuen übergreifend miteinander vergleichbar.

Diese Beobachtungen werfen allerdings auch einige weitere Fragen und Überlegungen auf:

- Korreliert der EtG-Gehalt im Barthaar mit dem in Haaren anderer Körperregionen, oder sind die Einlagerungsmechanismen voneinander unabhängig?  
Kerekes et al. [31] führten dazu Studien durch und konnten einen signifikanten Unterschied im EtG-Gehalt zwischen Kopfharen und Schamhaaren feststellen. In einem Fall war dieser auch im Barthaar um das Vierfache im Vergleich zum Kopfhaar erhöht, jedoch war die Datenlage für eine generelle Beurteilung dieses Sachverhaltes nicht ausreichend.  
Kintz et al. [32] publizierten Ergebnisse, welche eindeutig zeigten, dass der EtG-Gehalt im Schamhaar bei der gleichen Versuchsperson deutlich höher war als im Kopfhaar.  
Pianta et al. [19] zeigten, dass Brusthaar in bestimmten Fällen eine Alternative zu Kopfhaar darstellen kann. Dies gilt ebenso für Arm- oder Beinhaar, insbesondere bei bekanntem chronisch exzessivem Alkoholkonsum. Achselhaar wiederum stellte keine Alternative dar: Auswascheffekte durch häufige Reinigung und den Kontakt mit Tensiden können den EtG-Gehalt beeinflussen.
- Kann dieses Verhalten durch weitere zugeführte Nahrungsmittel modifiziert werden? Gibt es Unterschiede, ob nüchtern getrunken wird, oder postprandial? Und wenn ja, hat die Art des Essens einen Einfluss?
- Wie hoch ist der Einfluss durch Flüssigkeitsaufnahme, Schwitzen oder sportlicher Betätigung?
- Man kann sich vorstellen, dass die individuelle Schwankung bei Betrachtung eines längeren Haarsegmentes zwischen drei und sechs Zentimetern bei einigermaßen regelmäßiger Alkoholfuhr durch die große Menge einzelner Trinkereignisse ausgeglichen wird. Wie verhält es sich für die Bewertung des EtG-Gehaltes im Kopfhaar mehrerer Personen? Ist bei geringer Einlagerung ins Barthaar auch wenig ins Kopfhaar eingelagert? Ist es bei Individuen, die *schlechte Einlagerer*<sup>12</sup> sind, sinnvoll eine Klassifizierung nach SoHT Richtlinien vorzunehmen? Sind die Cut-offs richtig gewählt? Sind die Unterschiede möglicherweise so groß, dass keine Klassifizierung möglich ist?

Diese Themen sollten Gegenstand weiterer Forschung sein.

#### 4.4.3 Einlagerungsverhalten der Glucuronide ausgewählter Wirkstoffe und Genussmittel

##### Versuche zum Nachweis von Cotinin-N-Glucuronid im Kopfhaar von Rauchern

Ziel des Versuches war es, festzustellen, ob eine Einlagerung von Cotinin- $\beta$ -D-glucuronid nachweisbar ist. Bei Raucher 1 wurden ca. sieben Zigaretten am Tag konsumiert, bei Raucher 2 waren es ca. 20 Zigaretten am Tag.

Kopfhaar von zwei Rauchern (ca. 5 cm Länge) wurde gesammelt und ohne Waschung durch *Mikropulverisierung* extrahiert. 50  $\mu$ L des Extraktes wurden ins LC-MS/MS-System injiziert unter Verwendung der Methode in Kapitel 3.3.4.

Bei Anwesenheit des Glucuronids von Cotinin müsste ein Signal bei 1,98 Minuten mit den typischen Übergängen aus Tabelle 32 zu sehen sein. Das Chromatogramm in Abbildung 46 zeigt die Massenspuren zur Detektion potentiell vorhandenen Cotinin-Glucuronids. Bei Vorhandensein von Cotininglucuronid müssen im Chromatogramm die Massenspuren aller drei Übergänge (352,953  $\rightarrow$  177,1; 352,953  $\rightarrow$  80,1 und 352,953  $\rightarrow$  146,0) ein Signal liefern.

<sup>12</sup> Hier sind mehrere Szenarien denkbar: Schlechtes Einlagerungsverhalten, schlechte oder langsame Glucuronidierer, schnelles Ausscheidungsverhalten usw.

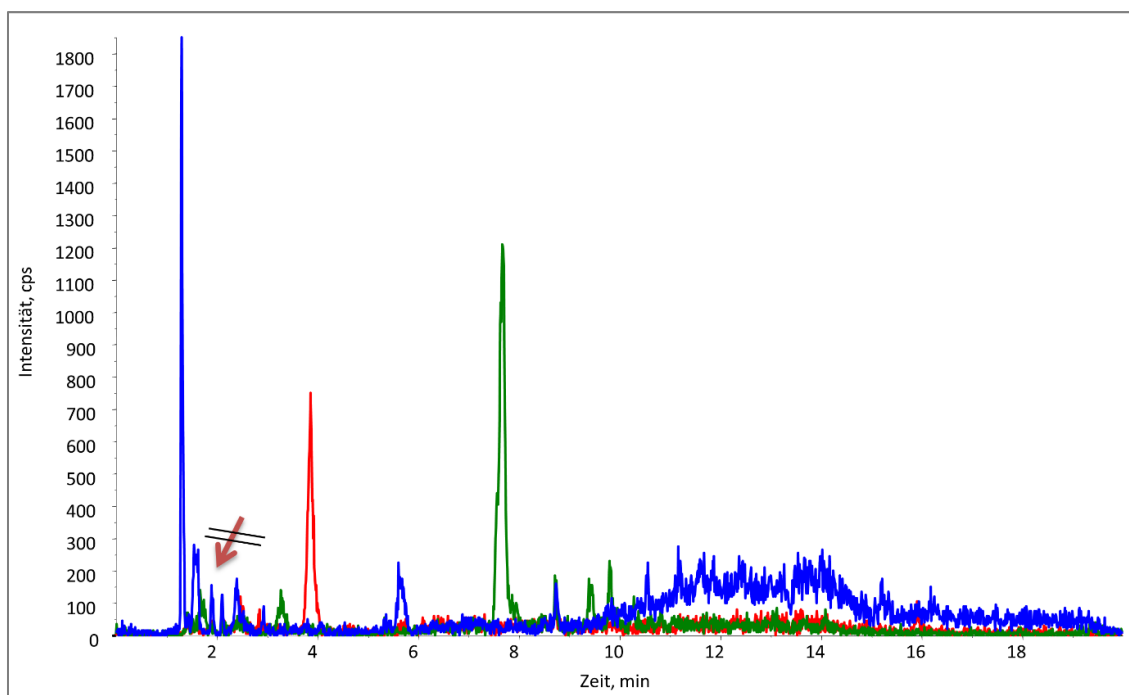


Abbildung 46: Chromatogramm des Haarextraktes von Raucher 1

LC-MS/MS; Massenübergänge ausgehend vom Mutterion mit  $m/z = 352,953$ : blau: Quantifier ( $m/z = 177,1$ ), grün: Qualifier 1 ( $m/z = 80,1$ ), rot: Qualifier 2 ( $m/z = 146,0$ ); kein Cotinin- $\beta$ -D-glucuronid vorhanden, Signal bei 1,98 Minuten fehlt (roter Pfeil)

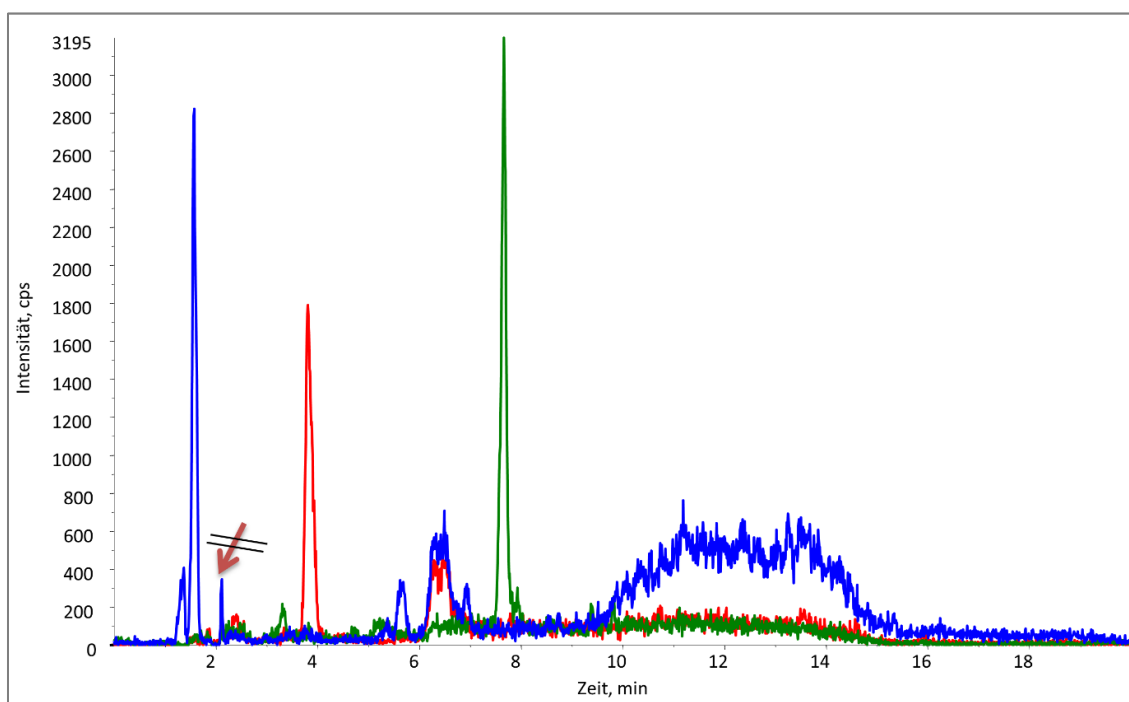


Abbildung 47: Chromatogramm des Haarextraktes von Raucher 2

LC-MS/MS; Massenübergänge ausgehend vom Mutterion mit  $m/z = 352,953$ : blau: Quantifier ( $m/z = 177,1$ ), grün: Qualifier 1 ( $m/z = 80,1$ ), rot: Qualifier 2 ( $m/z = 146,0$ ); kein Cotinin- $\beta$ -D-glucuronid vorhanden, Signal bei 1,98 Minuten fehlt (roter Pfeil)

Tatsächlich war kein Cotinin- $\beta$ -D-glucuronid nachweisbar (vergleiche fehlende Signale bei  $R_t = 1,98$  min). Abbildung 47 zeigt das Chromatogramm des Haarextraktes, welcher von den Haaren des Rauchers 2 gewonnen wurde.

Auch bei Raucher 2 konnte kein Cotinin- $\beta$ -D-glucuronid detektiert werden. Mögliche Ursachen waren eine nicht ausreichende Extraktion oder eine zu hohe Nachweisgrenze. Da es sich jedoch um einen sehr polaren Analyten handelte, konnte mit einer ausreichend hohen Extraktion des Analyten durch Wasser gerechnet werden. Durch die hohe Hydrophilie der Substanz mit einer positiven Permanentladung am Pyridinstickstoff kann sie nur schwer durch Zellmembranen hindurch diffundieren (vergleiche dazu Abbildung 5). In diesem Falle ist Cotinin- $\beta$ -D-glucuronid wahrscheinlich kein im Realfall auftretender Kreuzreaktant für einen antikörper-basierten Schnelltest.

### **Selbstversuche: Acetylsalicylsäure-acyl- $\beta$ -D-glucuronid, Paracetamol-4- $\beta$ -D-glucuronid und Propofol- $\beta$ -D-glucuronid**

In einem kontrollierten Selbstversuch wurden die chemischen Verbindungen Acetylsalicylsäure, Paracetamol und Propofol aufgenommen und die Einlagerung ins Barthaar untersucht. Dazu wurde eine dokumentierte Menge der Substanzen oral eingenommen, bis auf Propofol, welches während eines Krankenhausaufenthaltes i.v. in operationsüblicher, aber unbekannter Dosis appliziert wurde. Barthaare wurden im dokumentierten Zeitraum gesammelt und ohne Waschung nach Kapitel 3.2.1 extrahiert und mittels HPLC-MS/MS analysiert. Folgende Mengen der Substanzen wurden aufgenommen.

Acetylsalicylsäure:	4,0 g über 5 Tage, Rasur an Tag 9
Paracetamol:	4,0 g über 2 Tage, Rasur an Tag 6
Propofol:	unbekannte Dosis, Rasur 4 Tage nach Applikation

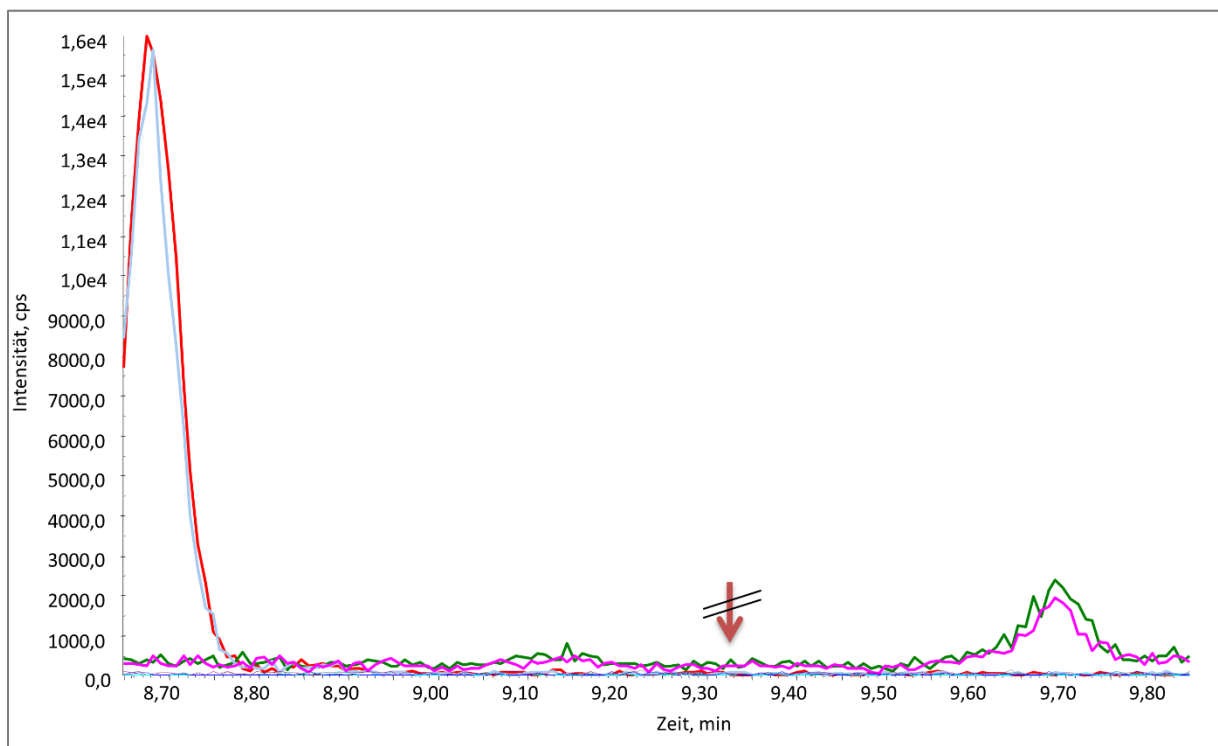


Abbildung 48: Chromatogramm eines Barthaarextraktes nach Aspirin-Einnahme LC-MS/MS; Massenübergänge ausgehend vom Mutterion mit  $m/z = 354,940$ : blau: Quantifier ( $m/z = 113,0$ ), grün: Qualifier 1 ( $m/z = 174,8$ ), rot: Qualifier 2 ( $m/z = 136,9$ ); kein Acetylsalicylsäure-acyl-glucuronid vorhanden, Signal bei 9,33 Minuten fehlt (roter Pfeil)

Acetylsalicylsäure-acyl- $\beta$ -D-glucuronid konnte mittels HPLC-MS/MS-Analytik nicht im Barthaar detektiert werden. Möglicherweise wurde die Substanz nur unzureichend oder überhaupt nicht im Haar eingelagert, jedoch lag auch der LOD der Methode bei deutlich über acht Nanogramm pro Milliliter, es ist also durchaus möglich, dass die Substanz nicht detektierbar war, obwohl vorhanden (Abbildung 48).

Paracetamol-4- $\beta$ -D-glucuronid konnte nach Aufnahme von Paracetamol im Barthaar detektiert werden. Durch die Beobachtung von drei Massenübergängen bei der HPLC-MS/MS- Analytik konnte die Substanz zweifelsfrei nachgewiesen werden (Abbildung 49, grüner Pfeil).

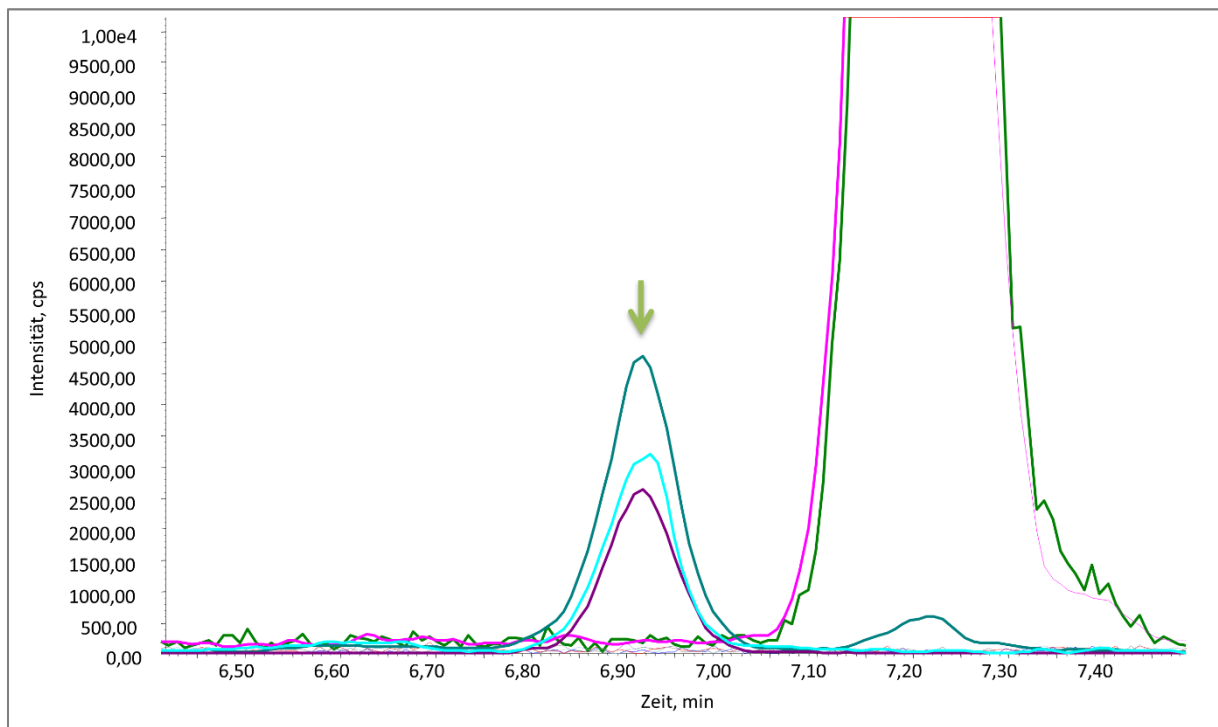


Abbildung 49: Chromatogramm eines Barthaarextraktes nach Paracetamol-Einnahme LC-MS/MS; Massenübergänge ausgehend vom Mutterion mit  $m/z = 325,923$ : blau: Quantifier ( $m/z = 112,9$ ), grün: Qualifier 1 ( $m/z = 174,7$ ), rot: Qualifier 2 ( $m/z = 149,9$ ); Paracetamol-4- $\beta$ -D-glucuronid nachweisbar, Signal bei 6,92 Minuten (grüner Pfeil)

Der Metabolit diffundierte offensichtlich gut in die Barthaarmatrix, was ihn dadurch nachweisbar machte. Dadurch wird das Glucuronid des Paracetamols zu einem potentiellen Kreuzreaktanden im Schnelltestverfahren (Kap. 4.3), da es nach Applikation der Muttersubstanz Paracetamol tatsächlich als Metabolit im Haar auftrat.

Auch Propofol- $\beta$ -D-glucuronid konnte eindeutig nachgewiesen werden. Ein Chromatogramm ist mit Abbildung 50 gegeben.

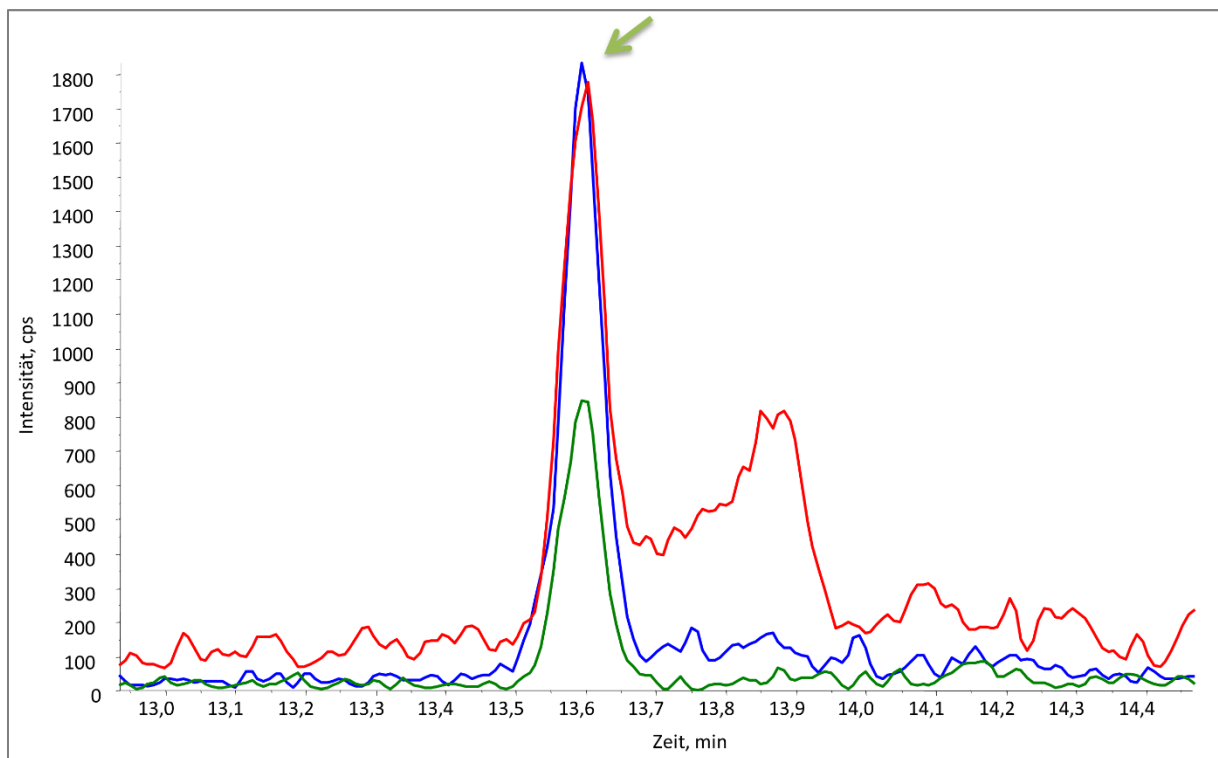


Abbildung 50: Chromatogramm eines Barthaarextraktes nach Propofol-Applikation LC-MS/MS; Massenübergänge ausgehend vom Mutterion mit  $m/z = 352,996$ : blau: Quantifier ( $m/z = 176,9$ ), grün: Qualifier 1 ( $m/z = 112,9$ ), rot: Qualifier 2 ( $m/z = 174,7$ ); Propofol- $\beta$ -D-glucuronid nachweisbar, Signal bei 13,60 Minuten (grüner Pfeil)

Dies bestätigte die Arbeiten von Kim et al. [141, 142], denen es möglich war, Propofol- $\beta$ -D-glucuronid als Missbrauchsdroge in Haaren zu analysieren. Es handelt sich also ebenfalls um einen potentiellen Kreuzreaktanden.

Die vorliegenden Experimente zeigten folgende Aspekte auf:

- Einlagerungsexperimente mit drei Probanden zeigen deutliche individuelle Unterschiede zwischen aufgenommener Ethanolmenge und nachgewiesenem EtG-Gehalt in Barthaaren.
- Durch die Analyse von Raucherhaaren konnte gezeigt werden, dass keine nennenswerten Mengen an Cotinin- $\beta$ -D-glucuronid in die Haarmatrix eingelagert wurden.
- Durch Selbstexperimente konnte gezeigt werden, dass sowohl die Glucuronide von Paracetamol, als auch Propofol in die Haarmatrix übergehen und dort nachweisbar sind.

Ausblick und weitere Experimente:

- Weitere Selbstversuche, um eine Einlagerung verschiedener Glucuronide ins Haar nachzuweisen
- Screening von bekannt belasteten Proben (Krankenhaus etc.)
- Erweiterung der Methode um weitere Glucuronide
- Etablierung einer Non-Target-Analytik basierend auf der Rückwärtssuche, ausgehend von bekannten Glucuronidfragmenten

## **Zusammenfassung und Ausblick**

Die Ergebnisse der vorgestellten Experimente führen zu folgenden zusammenfassenden Aussagen und eröffnen Ausblicke auf mögliche weiterführende Experimente.

Der erste Teil beschreibt die Entwicklung eines qualitätsgesicherten Verfahrens zur Extraktion und Bestimmung von EtG in Haaren. Die Extraktion erfolgte hauptsächlich mittels Mikropulverisierung, die analytische Bestimmung mit HPLC-MS/MS. Der hohen Matrixbelastung durch wässrige Extraktion von EtG ist die anspruchsvolle Analytik geschuldet, welche hoher Ionensuppressionseffekte unterliegt. Diese können gut durch die Trennung über Graphen-Phasen vermindert werden. Dennoch wäre die Reduktion der Matrixbestandteile ein wünschenswerter Fortschritt bei der Bestimmung von EtG mittels HPLC-MS/MS, zumal Graphen-Phasen kostenintensiv sind. Ebenso wäre ein Wechsel hin zu Reversed-Phase-Säulen erstrebenswert, da diese in der Regel aufgrund stark inaktiver Silica-Oberflächen robuster und auch kostengünstiger sind.

Im zweiten Abschnitt erfolgt die Einführung qualitätssichernder Maßnahmen. Sowohl der Restgehalt von Ethylglucuronid im internen Standard, die Herstellung und Charakterisierung von Haar-Referenzmaterialien und die Untersuchungen zur Stabilität des Analyten in der Haarmatrix trugen maßgeblich zur Qualität des Verfahrens bei. Dies bestätigen auch die sehr guten Ergebnisse bei der Teilnahme an den SoHT-Ringversuchen zu EtG in Haaren. Eine Weiterentwicklung der hergestellten Haar-Referenzmaterialien könnte der Schritt der Zertifizierung sein. Vor Allem in Verbindung mit einem Kooperationspartner könnte somit ein kommerziell erwerbliches, zertifiziertes Referenzmaterial hergestellt und vertrieben werden.

Der dritte Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Kooperationsprojekt zur Etablierung eines antikörperbasierten Schnelltestverfahrens für EtG in Haaren. Während die Verantwortung zur Herstellung der potentiell EtG-bindenden Antikörper beim Projektpartner in Potsdam lag, leistete die BAM analytische Betreuung während des gesamten Projektes. Dazu zählte ebenso das Herstellen von Haarextrakten definierten EtG-Gehaltes zur Testentwicklung. Darüber hinaus wurden die methodischen Grundsteine für das massenspektrometrische Screening auf potentielle Kreuzreaktanden, vornehmlich glucuronidierte Substanzen, gelegt. Auch der externe Einflussfaktor des oxidativen Bleichens von Haaren auf deren EtG-Gehalt hin wurde eingehend untersucht und sogar ein Schnelltestverfahren zur Detektion dieser Manipulation entwickelt.

Für den vierten und letzten Abschnitt rückte das Modell Barthaar in den Vordergrund. An ihm konnte die Einlagerung von EtG und anderen Glucuroniden in den Tagen unmittelbar nach Konsum der nicht-glucuronidierten Muttersubstanzen beobachtet werden. Für EtG gelten offenbar nicht unbedingt für jedes Individuum die gleichen Maßstäbe, betrachtet man die nachweisbare EtG-Menge im Barthaar im Vergleich zu der konsumierten Alkoholmenge. Diese kann von den unterschiedlichsten Faktoren abhängig sein, wie z.B. der Art und Menge der aufgenommenen Mahlzeiten und Getränke oder körperlicher Betätigung. Ebenso dürften individuelle Schwankungen bezüglich der Biotransformation von Ethanol gegeben sein. Weiterführende Studien sollten die Zusammenhänge zwischen eingelagerter EtG-Menge ins Barthaar und äußeren Einflussfaktoren aufklären und auch Rückschlüsse auf den EtG-Gehalt in Kopfhair zulassen. Betrachtet man die untersuchten Glucuronide, so war es bei zumindest zwei der detektierbaren Substanzen möglich, einen Übergang in die Haarmatrix nachzuweisen. Die Nachweisbarkeit weiterer Glucuronide in der Haarmatrix sollte Gegenstand der Forschung werden, möglicherweise in Zusammenarbeit mit Kliniken oder forensischen Instituten, die Haarmaterialien bereitstellen könnten, bei denen ein Konsum von bestimmten Pro-Glucuronid-Substanzen bekannt ist. Vor Allem in Hinblick auf die mögliche Etablierung eines antikörper-basierten Schnelltestes ist dies unerlässlich.

## Literaturverzeichnis

1. Hengartner, T. and Merki, M.C.H., **Alkoholische Getränke**, Genußmittel. Eine Kulturgeschichte, 2. Aufl. 2001
2. Magellanworld.net. **Trinksitten-Informationen**, Available from: <http://www.magellanworld.net>
3. Krünitz, **Trinken**, Oeconomische Encyclopädie.
4. kenn-dein-limit.de. Available from: <http://www.kenn-dein-limit.de>
5. Tillonen, J., **Ethanol, acetaldehyde and gastrointestinal flora**. 2000
6. Connor, J., **Alcohol consumption as a cause of cancer**. Addiction, 2016
7. Effertz, T., **Die Volkswirtschaftlichen Kosten Gefährlicher Konsumgüter: Eine Theoretische und Empirische Analyse Für Deutschland Am Beispiel Alkohol, Tabak und Adipositas**, 2015
8. Pragst, F., Rothe, M., Moench, B., Hastedt, M., Herre, S. and Simmert, D., **Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: interpretation and advantages**. Forensic Science International, Vol. 196(1-3), 101-110, 2010
9. Cabarcos, P., Alvarez, I., Tabernero, M.J. and Bermejo, A.M., **Determination of direct alcohol markers: a review**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 407(17), 4907-4925, 2015
10. Kharbouche, H., Sporkert, F., Troxier, S., Augsburg, M., Mangin, P. and Staub, C., **Development and validation of a gas chromatography-negative chemical ionization tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair and its application to forensic toxicology**. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, Vol. 877(23), 2337-2343, 2009
11. Kamil, I.A., Smith, J.N. and Williams, R.T., **A New Aspect of Ethanol Metabolism - Isolation of Ethyl-Glucuronide**. Biochemical Journal, Vol. 51(4), R32-R33, 1952
12. Jaakonmaki, P.I., Knox, K.L., Horning, E.C. and Horning, M.G., **The characterization by gas-liquid chromatography of ethyl  $\beta$ -D-glucosiduronic acid as a metabolite of ethanol in rat and man**. European Journal of Pharmacology, Vol. 1(1), 63-70, 1967
13. Schmitt, G., Aderjan, R., Keller, T. and Wu, M., **Ethyl Glucuronide: An Unusual Ethanol Metabolite in Humans. Synthesis, Analytical Data, and Determination in Serum and Urine**. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 19(2), 91-94, 1995
14. Pragst, F., Spiegel, K., Sporkert, F. and Bohnenkamp, M., **Are there possibilities for the detection of chronically elevated alcohol consumption by hair analysis? A report about the state of investigation**. Forensic Science International, Vol. 107(1-3), 201-223, 2000
15. Yegles, M., Labarthe, A., Auwarter, V., Hartwig, S., Vater, H., Wennig, R. and Pragst, F., **Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers**. Forensic Science International, Vol. 145(2-3), 167-173, 2004
16. Agius, R., Ferreira, L.M. and Yegles, M., **Can ethyl glucuronide in hair be determined only in 3 cm hair strands?** Forensic Science International, Vol. 218(1-3), 3-9, 2012
17. Schrader, J., Rothe, M. and Pragst, F., **Ethyl glucuronide concentrations in beard hair after a single alcohol dose: evidence for incorporation in hair root**. International Journal of Legal Medicine, Vol. 126(5), 791-799, 2012
18. Rainio, J., De Giorgio, F., Bortolotti, F. and Tagliaro, F., **Objective post-mortem diagnosis of chronic alcohol abuse--a review of studies on new markers**. Legal medicine (Tokyo, Japan), Vol. 10(5), 229-235, 2008
19. Pianta, A., Liniger, B. and Baumgartner, M.R., **Ethyl Glucuronide in Scalp and Non-head Hair: An Intra-individual Comparison**. Alcohol and Alcoholism, Vol. 48(3), 295-302, 2013
20. Bakdash, A., Burger, P., Goecke, T.W., Fasching, P.A., Reulbach, U., Bleich, S., Hastedt, M., Rothe, M., Beckmann, M.W., Pragst, F. et al., **Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 396(7), 2469-2477, 2010



21. Tarcomnicu, I., van Nuijs, A.L., Aerts, K., De Doncker, M., Covaci, A. and Neels, H., **Ethyl glucuronide determination in meconium and hair by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. Forensic Science International, Vol. 196(1-3), 121-127, 2010
22. Morini, L., Marchei, E., Vagnarelli, F., Garcia Algar, O., Groppi, A., Mastrobattista, L. and Pichini, S., **Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair-potential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol**. Forensic Science International, Vol. 196(1-3), 74-77, 2010
23. Morini, L., Marchei, E., Pellegrini, M., Groppi, A., Stramesi, C., Vagnarelli, F., Garcia-Algar, O., Pacifici, R. and Pichini, S., **Liquid Chromatography With Tandem Mass Spectrometric Detection for the Measurement of Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate in Meconium: New Biomarkers of Gestational Ethanol Exposure?** Therapeutic Drug Monitoring, Vol. 30(6), 725-732, 2008
24. Pichini, S., Morini, L., Marchei, E., Palmi, I., Rotolo, M.C., Vagnarelli, F., Garcia-Algar, O., Vall, O. and Zuccaro, P., **Ethylglucuronide and ethylsulfate in meconium to assess gestational ethanol exposure: preliminary results in two Mediterranean cohorts**. The Canadian journal of clinical pharmacology, Vol. 16(2), e370-375, 2009
25. Morini, L., Groppi, A., Marchei, E., Vagnarelli, F., Algar, O.G., Zuccaro, P. and Pichini, S., **Population Baseline of Meconium Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate Concentrations in Newborns of Nondrinking Women in 2 Mediterranean Cohorts**. Therapeutic Drug Monitoring, Vol. 32(3), 359-363, 2010
26. Agius, R., Nadulski, T., Kahl, H.G. and Dufaux, B., **Ethyl glucuronide in hair - A highly effective test for the monitoring of alcohol consumption**. Forensic Science International, Vol. 218(1-3), 10-14, 2012
27. Albermann, M.E., Musshoff, F. and Madea, B., **A fully validated high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair for the proof of strict alcohol abstinence**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 396(7), 2441-2447, 2010
28. Albermann, M.E., Musshoff, F. and Madea, B., **Comparison of ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) concentrations in hair for testing abstinence**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 400(1), 175-181, 2011
29. Appenzeller, B.M.R., Schuman, M., Yegles, M. and Wennig, R., **Ethyl glucuronide concentration in hair is not influenced by pigmentation**. Alcohol and Alcoholism, Vol. 42(4), 326-327, 2007
30. Janda, I., Weinmann, W., Kuehnle, T., Lahode, M. and Alt, A., **Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS**. Forensic Science International, Vol. 128(1-2), 59-65, 2002
31. Kerekes, I., Yegles, M., Grimm, U. and Wennig, R., **Ethyl glucuronide determination: head hair versus non-head hair**. Alcohol Alcohol, Vol. 44(1), 62-66, 2009
32. Kintz, P., Villain, M., Vallet, E., Etter, M., Salquebre, G. and Cirimele, V., **Ethyl glucuronide: unusual distribution between head hair and pubic hair**. Forensic Science International, Vol. 176(1), 87-90, 2008
33. Kronstrand, R., Brinkhagen, L. and Nystrom, F.H., **Ethyl glucuronide in human hair after daily consumption of 16 or 32 g of ethanol for 3 months**. Forensic Science International, Vol. 215(1-3), 51-55, 2012
34. Lamoureux, F., Gaulier, J.M., Sauvage, F.L., Mercierolle, M., Vallejo, C. and Lachatre, G., **Determination of ethyl-glucuronide in hair for heavy drinking detection using liquid chromatography-tandem mass spectrometry following solid-phase extraction**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 394(7), 1895-1901, 2009
35. Lees, R., Kingston, R., Williams, T.M., Henderson, G., Lingford-Hughes, A. and Hickman, M., **Comparison of Ethyl Glucuronide in Hair with Self-Reported Alcohol Consumption**. Alcohol and Alcoholism, Vol. 47(3), 267-272, 2012
36. Politi, L., Morini, L., Leone, F. and Poletti, A., **Ethyl glucuronide in hair: is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption?** Addiction, Vol. 101(10), 1408-1412, 2006

37. Politi, L., Morini, L., Mari, F., Groppi, A. and Bertol, E., **Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in autopsy samples 27 years after death**. International Journal of Legal Medicine, Vol. 122(6), 507-509, 2008
38. Shi, Y., Shen, B.H., Xiang, P., Yan, H. and Shen, M., **Determination of ethyl glucuronide in hair samples of Chinese people by protein precipitation (PPT) and large volume injection-gas chromatography-tandem mass spectrometry (LVI-GC/MS/MS)**. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, Vol. 878(30), 3161-3166, 2010
39. Skopp, G., Schmitt, G., Pötsch, L., Dröner, P., Aderjan, R. and Mattern, R., **Ethyl Glucuronide in Human Hair**. Alcohol & Alcoholism, Vol. 35(3), 3, 2000
40. Sticht, G., Käferstein, H. and Staak, M., **Determination of ethyl glucuronide in serum by gas-chromatography-mass spectrometry using propyl glucuronide as internal standard**. Rechtsmedizin, Vol. 7(5), 1997
41. Turfus, S.C., Beyer, J., Gerostamoulos, D. and Drummer, O.H., **A comparison of the performance of quality controls prepared from spiked, fortified and authentic hair for ethyl glucuronide analysis**. Forensic Science International, Vol. 232(1-3), 60-66, 2013
42. Dahl, H., Stephanson, N., Beck, O. and Helander, A., **Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide**. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 26(4), 201-204, 2002
43. Goll, M., Schmitt, G., Ganssmann, B. and Aderjan, R.E., **Excretion profiles of ethyl glucuronide in human urine after internal dilution**. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 26(5), 262-266, 2002
44. Hoiseith, G., Bernard, J.P., Karinen, R., Johnsen, L., Helander, A., Christophersen, A.S. and Morland, J., **A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: Applications to forensic toxicology**. Forensic Science International, Vol. 172(2-3), 119-124, 2007
45. Hoiseith, G., Yttredal, B., Karinen, R., Gjerde, H., Morland, J. and Christophersen, A., **Ethyl Glucuronide Concentrations in Oral Fluid, Blood, and Urine After Volunteers Drank 0.5 and 1.0 g/kg Doses of Ethanol**. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 34(6), 319-324, 2010
46. Kharbouche, H., Steiner, N., Morelato, M., Staub, C., Boutrel, B., Mangin, P., Sporkert, F. and Augsburg, M., **Influence of ethanol dose and pigmentation on the incorporation of ethyl glucuronide into rat hair**. Alcohol, Vol. 44(6), 507-514, 2010
47. Liniger, B., Nguyen, A., Friedrich-Koch, A. and Yegles, M., **Abstinence monitoring of suspected drinking drivers: ethyl glucuronide in hair versus CDT**. Traffic Injury Prevention, Vol. 11(2), 123-126, 2010
48. SoHT. **2014 Consensus for the Use of Alcohol Markers in Hair for Assessment of both Abstinence and Chronic Excessive Alcohol Consumption**, Available from: <http://www.soht.org/images/pdf/2014%20Alcohol%20markers%20revision%2013JUN14%20FINAL.pdf>
49. Soyka, M., **Klinische Alkoholismusdiagnostik**, 1999
50. Mutschler, Geisslinger, Kroemer, Ruth and Schaefer-Korting, **Mutschler Arzneimittelwirkungen**, 9. Auflage, 2008
51. Schummer, C., Appenzeller, B.M.R. and Wennig, R., **Quantitative determination of ethyl glucuronide in sweat**. Therapeutic Drug Monitoring, Vol. 30(4), 536-539, 2008
52. Besserer, K. and Schmidt, V., **Ein Beitrag zur renalen Ausscheidung von Äthylglucuronid nach oraler Alkoholaufnahme**. Zentralblatt Rechtsmedizin, Vol. 25, 1983
53. Hawkins, R.D. and Kalant, H., **The metabolism of ethanol and its metabolic effects**. Pharmacological Reviews, Vol. 24(1), 67-157, 1972
54. Lundquist, F., Tygstrup, N., Winkler, K., Mellemegaard, K. and Munck-Petersen, S., **Ethanol metabolism and production of free acetate in the human liver**. Journal of Clinical Investigation, Vol. 41(955-961), 1962
55. Wong, D.J. and Chang, H.Y., **Skin tissue engineering**, 2009
56. A., F., **Der Körper des Menschen**, 14. Auflage, 2004
57. Pötsch, L., **A discourse on human hair fibers and reflections on the conservation of drug molecules**. International Journal of Legal Medicine, Vol. 108(6), 285-293, 1996

58. Vogt, A., Hadam, S., Heiderhoff, M., Audring, H., Lademann, J., Sterry, W. and Blume-Peytavi, U., **Morphometry of human terminal and vellus hair follicles**. *Experimental Dermatology*, Vol. 16(11), 946-950, 2007
59. Trueb, R.M., **Haare. Praxis der Trichologie**, 2003
60. Mändle, C., Opitz-Kreuter, S. and Wehling, A., **Das Hebammenbuch : Lehrbuch der praktischen Geburtshilfe**, 2. Auflage, 1997
61. T. Nasemann, W.S., **Lehrbuch der Hautkrankheiten und venerischen Infektionen für Studierende und Ärzte**, 2013
62. Pragst, F. and Balikova, M.A., **State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse**. *Clinica Chimica Acta*, Vol. 370(1-2), 17-49, 2006
63. Bhatnagar, V., Anjaiah, S., Puri, N., Darshanam, B.N.A. and Ramaiah, A., **pH of Melanosomes of B-16 Murine Melanoma Is Acidic - Its Physiological Importance in the Regulation of Melanin Biosynthesis**. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 307(1), 183-192, 1993
64. Mackenna, R.M.B., Wheatley, V.R. and Wormald, A., **The Composition of the Surface Skin Fat (Sebum) from the Human Forearm**. *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 15(1), 33-47, 1950
65. Boughton, B. and Wheatley, V.R., **The Fatty Acid Composition of the Skin Surface Fat (Sebum) of Normal Human Subjects**. *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 33(2), 49-55, 1959
66. Powell, E.W. and Beveridge, G.W., **Sebum Excretion and Sebum Composition in Adolescent Men with and without Acne Vulgaris**. *British Journal of Dermatology*, Vol. 82(3), 243-8, 1970
67. Henderson, G.L., **Mechanisms of Drug Incorporation into Hair**. *Forensic Science International*, Vol. 63(1-3), 19-29, 1993
68. Monch, B., **Ethylglucuronid und seine Homologen - Beiträge zur Analytik in relevanten biologischen Matrices**. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 2014
69. Wright, A.W.E., Nocente, M.L. and Smith, M.T., **Hydromorphone-3-glucuronide: Biochemical synthesis and preliminary pharmacological evaluation**. *Life Sciences*, Vol. 63(5), 401-411, 1998
70. Ferreira, L.M., Binz, T. and Yegles, M., **The influence of ethanol containing cosmetics on ethyl glucuronide concentration in hair**. *Forensic Science International*, Vol. 218(1-3), 123-125, 2012
71. Arndt, T., Schrofel, S. and Stemmerich, K., **Ethyl glucuronide identified in commercial hair tonics**. *Forensic Science International*, Vol. 231(1-3), 195-198, 2013
72. Sporkert, F., Kharbouche, H., Augsburg, M.P., Klemm, C. and Baumgartner, M.R., **Positive EtG findings in hair as a result of a cosmetic treatment**. *Forensic Science International*, Vol. 218(1), 97-100,
73. Skopp, G., Schmitt, G., Potsch, L., Dronner, P., Aderjan, R. and Mattern, R., **Ethyl glucuronide in human hair**. *Alcohol Alcohol*, Vol. 35(3), 283-285, 2000
74. Schmitt, G., Dronner, P., Skopp, G. and Aderjan, R., **Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers, and suspected drinking drivers**. *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 42(6), 1099-1102, 1997
75. Alvarez, I., Bermejo, A.M., Jesus, M., Fernandez, P., Cabarcos, P. and Lopez, P., **Microwave-assisted extraction: a simpler and faster method for the determination of ethyl glucuronide in hair by gas chromatography-mass spectrometry**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 393(4), 1345-1350, 2009
76. Agius, R., Nadulski, T., Kahl, H.G., Schrader, J., Dufaux, B., Yegles, M. and Pragst, F., **Validation of a headspace solid-phase microextraction-GC-MS/MS for the determination of ethyl glucuronide in hair according to forensic guidelines**. *Forensic Science International*, Vol. 196(1-3), 3-9, 2010
77. Alt, A., Janda, I., Seidl, S. and Wurst, F., **Determination of ethyl glucuronide in hair samples**. *Alcohol & Alcoholism*, Vol. 35(3), 2, 2000

78. Hastedt, M., Herre, S., Pragst, F., Rothe, M. and Hartwig, S., **Workplace Alcohol Testing Program by Combined Use of Ethyl Glucuronide and Fatty Acid Ethyl Esters in Hair**. Alcohol and Alcoholism, Vol. 47(2), 127-132, 2012
79. Kharbouche, H., Faouzi, M., Sanchez, N., Daeppen, J.B., Augsburg, M., Mangin, P., Staub, C. and Sporkert, F., **Diagnostic performance of ethyl glucuronide in hair for the investigation of alcohol drinking behavior: a comparison with traditional biomarkers**. International Journal of Legal Medicine, Vol. 126(2), 243-250, 2012
80. Malkowska, A., Szutowski, M. and Dyr, W., **Deposition of ethyl glucuronide in WHP rat hair after chronic ethanol intake**. Pharmacological Reports, Vol. 64(8), 2012
81. Paul, R., Kingston, R., Tsanaclis, L., Berry, A. and Guwy, A., **Do drug users use less alcohol than non-drug users? A comparison of ethyl glucuronide concentrations in hair between the two groups in medico-legal cases**. Forensic Science International, Vol. 176(1), 82-86, 2008
82. Monch, B., Becker, R., Jung, C. and Nehls, I., **The homogeneity testing of EtG in hair reference materials: A high-throughput procedure using GC-NCI-MS**. Forensic Science International, Vol. 226(1-3), 202-207, 2013
83. Monch, B.B., R.; Nehls, I., **Determination of ethyl glucuronide in hair: a rapid sample pretreatment involving simultaneous milling and extraction**. International Journal of Legal Medicine, Vol. 128(69-72), 2014
84. Albermann, M.E., Musshoff, F., Aengenheister, L. and Madea, B., **Investigations on the influence of different grinding procedures on measured ethyl glucuronide concentrations in hair determined with an optimized and validated LC-MS/MS method**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 403(3), 769-776, 2012
85. Cabarcos, P., Hassan, H.M., Tabernero, M.J. and Scott, K.S., **Analysis of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)**. Journal of Applied Toxicology, Vol. 33(7), 638-643, 2013
86. Concheiro, M., Cruz, A., Mon, M., de Castro, A., Quintela, O., Lorenzo, A. and Lopez-Rivadulla, M., **Ethylglucuronide Determination in Urine and Hair from Alcohol Withdrawal Patients**. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 33(3), 155-161, 2009
87. Hoiseth, G., Morini, L., Ganss, R., Nordal, K. and Morland, J., **Higher Levels of Hair Ethyl Glucuronide in Patients with Decreased Kidney Function**. Alcoholism-Clinical and Experimental Research, Vol. 37(E14-E16), 2013
88. Hoiseth, G., Morini, L., Poletti, A., Christophersen, A. and Morland, J., **Ethyl Glucuronide in Hair Compared With Traditional Alcohol Biomarkers-A Pilot Study of Heavy Drinkers Referred to an Alcohol Detoxification Unit**. Alcoholism-Clinical and Experimental Research, Vol. 33(5), 812-816, 2009
89. Klys, M., Wozniak, K., Rojek, S., Rzepecka-Wozniak, E. and Kowalski, P., **Ethanol-related death of a child: An unusual case report**. Forensic Science International, Vol. 179(1), E1-E4, 2008
90. Morini, L., Politi, L., Acito, S., Groppi, A. and Poletti, A., **Comparison of ethyl glucuronide in hair with carbohydrate-deficient transferrin in serum as markers of chronic high levels of alcohol consumption**. Forensic Science International, Vol. 188(1-3), 140-143, 2009
91. Morini, L., Politi, L., Groppi, A., Stramesi, C. and Poletti, A., **Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry**. Journal of Mass Spectrometry, Vol. 41(1), 34-42, 2006
92. Morini, L., Politi, L. and Poletti, A., **Ethyl glucuronide in hair. A sensitive and specific marker of chronic heavy drinking**. Addiction, Vol. 104(6), 915-920, 2009
93. Politi, L., Zucchella, A., Morini, L., Stramesi, C. and Poletti, A., **Markers of chronic alcohol use in hair: Comparison of ethyl glucuronide and cocaethylene in cocaine users**. Forensic Science International, Vol. 172(1), 23-27, 2007
94. Pragst, F., **Interpretation problems in a forensic case of abstinence determination using alcohol markers in hair**. Forensic Science International, Vol. 217(1-3), E4-E7, 2012
95. Stewart, S.H., Koch, D.G., Willner, I.R., Randall, P.K. and Reuben, A., **Hair Ethyl Glucuronide is Highly Sensitive and Specific for Detecting Moderate-to-Heavy Drinking in Patients with Liver Disease**. Alcohol and Alcoholism, Vol. 48(1), 83-87, 2013

96. Kummer, N., Wille, S., Di Fazio, V., Lambert, W. and Samyn, N., **A fully validated method for the quantification of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in urine by UPLC-ESI-MS/MS applied in a prospective alcohol self-monitoring study.** Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, Vol. 929(149-154), 2013
97. Monch, B., Becker, R. and Nehls, I., **Quantification of Ethyl Glucuronide in Hair: Effect of Milling on Extraction Efficiency.** Alcohol and Alcoholism, Vol. 48(5), 558-563, 2013
98. Alter, H. and Bit-Alkhas, M., **Infrared Analysis of Oxidized Keratin.** Textile Research Journal, Vol. 39(4), 1969
99. Hilterhaus-Bong, S. and Zahn, H., **Contributions to the chemistry of human hair. I. Analyses of cystine, cysteine and cystine oxides in untreated human hair.** International Journal of Cosmetic Science, Vol. 9(9), 1987
100. Strassburger, J. and Breuer, M.M., **Quantitative Fourier Transform Infrared Spectroscopy of oxidized Hair.** Journal of the Society of Cosmetic Chemists, Vol. 36(14), 1984
101. Grubbs, F.E., **Sample Criteria for Testing Outlying Observations.** Vol. 27-58, 1950
102. Grubbs, F.E., **Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples.** Technometrics, Vol. 11(1), 1-21, 1969
103. Horwitz, W., **Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs.** Analytical Chemistry, Vol. 54(1), 67A-76A, 1982
104. F., C., **Statistical Methods for use in Proficiency Testing** Vol. 2009
105. ISO, **ISO Guide 35:2006 - Reference materials - General and statistical principles for certification**, 2006
106. Linsinger, T.P.J., Pauwels, J., van der Veen, A.M.H., Schimmel, H. and Lamberty, A., **Homogeneity and stability of reference materials.** Accreditation and Quality Assurance, Vol. 6(1), 20-25, 2001
107. Ammann, D., Becker, R. and Nehls, I., **Stability of ethyl glucuronide in hair reference materials after accelerated aging.** Forensic Science International, Vol. 257(337-340-9, 2015
108. Becker, R., Buge, H.G., Bremser, W. and Nehls, I., **Mineral oil content in sediments and soils: comparability, traceability and a certified reference material for quality assurance.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 385(3), 645-651, 2006
109. Bremser, W., Becker, R., Kipphardt, H., Lehnik-Habrink, P., Panne, U. and Töpfer, A., **Stability testing in an integrated scheme.** Accreditation and Quality Assurance, Vol. 11(10), 489-495, 2006
110. Crunelle, C.L., Yegles, M., De Doncker, M., Dom, G., Cappelle, D., Maudens, K.E., van Nuijs, A.L., Covaci, A. and Neels, H., **Influence of repeated permanent coloring and bleaching on ethyl glucuronide concentrations in hair from alcohol-dependent patients.** Forensic Science International, Vol. 247(18-22), 2015
111. Ettlinger, J., Kirchen, L. and Yegles, M., **Influence of thermal hair straightening on ethyl glucuronide content in hair.** Drug Testing and Analysis, Vol. 6 Suppl 1(74-77), 2014
112. Lequin, R.M., **Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** Clinical Chemistry, Vol. 51(12), 2415-2418, 2005
113. Jensen, L.S., Valentine, J., Milne, R.W. and Evans, A.M., **The quantification of paracetamol, paracetamol glucuronide and paracetamol sulphate in plasma and urine using a single high-performance liquid chromatography assay.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 34(3), 585-593, 2004
114. Bienert, A., Kaminska, A., Olszewski, J., Gracz, J., Grabowski, T., Wolc, A. and Grzeskowiak, E., **Pharmacokinetics and ocular disposition of paracetamol and paracetamol glucuronide in rabbits with diabetes mellitus induced by alloxan.** Pharmacological Reports, Vol. 64(2), 421-427, 2012
115. Santos, L.H., Paiga, P., Araujo, A.N., Pena, A., Delerue-Matos, C. and Montenegro, M.C., **Development of a simple analytical method for the simultaneous determination of paracetamol, paracetamol-glucuronide and p-aminophenol in river water.** Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, Vol. 930(75-81), 2013

116. Karbownik, A., Szalek, E., Sobanska, K., Polom, W., Grabowski, T., Biczysko-Murawa, A., Matuszewski, M., Wolc, A. and Grzeskowiak, E., **The effect of sunitinib on the plasma exposure of intravenous paracetamol and its major metabolite: paracetamol glucuronide.** European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Vol. 40(2), 163-170, 2015
117. Crabtree, R.E., Data, J.B. and Christian, J.E., **A study of the oxidative metabolism of acetylsalicylic, salicylic, and gentisic acid in fevered animals.** Journal of the American Pharmacists Association, Vol. 47(8), 602-605, 1958
118. Artis, R.D., Johnson, P.K. and Free, A.H., **A simplified test for the detection of paraaminosalicylic acid and acetylsalicylic acid metabolites in urine.** The American review of respiratory disease, Vol. 84(435-439), 1961
119. Needs, C.J. and Brooks, P.M., **Clinical pharmacokinetics of the salicylates.** Clinical Pharmacokinetics, Vol. 10(2), 164-177, 1985
120. Montgomery, P.R., Berger, L.G., Mitenko, P.A. and Sitar, D.S., **Salicylate metabolism - effects of age and sex in adults.** Clinical Pharmacology & Therapeutics, Vol. 39(5), 571-576, 1986
121. Montgomery, P.R. and Sitar, D.S., **Acetylsalicylic-acid metabolites in blood and urine after plain and enteric-coated tablets.** Biopharmaceutics & Drug Disposition, Vol. 7(1), 21-25, 1986
122. De La Pena, A.M., Duran-Meras, I., Moreno, M.D., Salinas, F. and Galera, M.M., **Simultaneous fluorimetric determination of acetylsalicylic acid metabolites in urine by partial least squares multivariate calibration.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 353(2), 211-214, 1995
123. Hansen, S.H., Jensen, M.E. and Bjornsdottir, I., **Assay of acetylsalicylic acid and three of its metabolites in human plasma and urine using non-aqueous capillary electrophoresis with reversed electroosmotic flow.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 17(6-7), 1155-1160, 1998
124. Navarro, S.L., Saracino, M.R., Makar, K.W., Thomas, S.S., Li, L., Zheng, Y.Y., Levy, L., Schwarz, Y., Bigler, J., Potter, J.D. et al., **Determinants of Aspirin Metabolism in Healthy Men and Women: Effects of Dietary Inducers of UDP-Glucuronosyltransferases.** Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics, Vol. 4(2), 110-118, 2011
125. Castillo-Garcia, M.L., Aguilar-Caballos, M.P. and Gomez-Hens, A., **Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolites in bovine urine using ultra performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, Vol. 985(85-90), 2015
126. Schaefer, W.H., Goalwin, A., Dixon, F., Hwang, B., Killmer, L. and Kuo, G., **Structural Determination of Glucuronide Conjugates and a Carbamoyl Glucuronide Conjugate of Carvedilol - Use of Acetylation Reactions as an Aid to Determine Positions of Glucuronidation.** Biological Mass Spectrometry, Vol. 21(4), 179-188, 1992
127. Neugebauer, G., Akpan, W., V, M.E., Neubert, P. and Reiff, K., **Pharmacokinetics and disposition of carvedilol in humans.** Journal of Cardiovascular Pharmacology, Vol. 10(SUPPL. 11), S85-S88, 1987
128. Neugebauer, G. and Neubert, P., **Metabolism of carvedilol in man.** European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Vol. 16(4), 257-260, 1991
129. Schaefer, W.H., Politowski, J., Hwang, B., Dixon, F., Goalwin, A., Gutzait, L., Anderson, K., Debrosse, C., Bean, M. and Rhodes, G.R., **Metabolism of carvedilol in dogs, rats, and mice.** Drug Metabolism and Disposition, Vol. 26(10), 958-969, 1998
130. Ohno, A., Saito, Y., Hanioka, N., Jinno, H., Saeki, M., Ando, M., Ozawa, S. and Sawada, J., **Involvement of human hepatic UGT1A1, UGT2B4, and UGT2B7 in the glucuronidation of carvedilol.** Drug Metabolism and Disposition, Vol. 32(2), 235-239, 2004
131. Silvestro, L., Gheorghe, M., Iordachescu, A., Ciuca, V., Tudoroni, A., Savu, S.R. and Tarcomnicu, I., **Development and validation of an HPLC-MS/MS method to quantify clopidogrel acyl glucuronide, clopidogrel acid metabolite, and clopidogrel in plasma samples avoiding analyte back-conversion.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 401(3), 1023-1034, 2011

132. Richie, J.P., Leutzinger, Y., Axelrad, C.M. and Haley, N.J., **Contribution of Trans 3'-Hydroxycotinine and Glucuronide Conjugates of Nicotine Metabolites to the Measurement of Cotinine by Ria.** *Effects of Nicotine on Biological Systems*, Vol. 77-81, 1991
133. Byrd, G.D., Chang, K.M., Greene, J.M. and Debethizy, J.D., **Evidence for Urinary-Excretion of Glucuronide Conjugates of Nicotine, Cotinine, and Trans-3'-Hydroxycotinine in Smokers.** *Drug Metabolism and Disposition*, Vol. 20(2), 192-197, 1992
134. Caldwell, W.S., Greene, J.M., Byrd, G.D., Chang, K.M., Uhrig, M.S., Debethizy, J.D., Crooks, P.A., Bhatti, B.S. and Riggs, R.M., **Characterization of the Glucuronide Conjugate of Cotinine - a Previously Unidentified Major Metabolite of Nicotine in Smokers Urine.** *Chemical Research in Toxicology*, Vol. 5(2), 280-285, 1992
135. Byrd, G.D., Uhrig, M.S., Debethizy, J.D., Caldwell, W.S., Crooks, P.A., Ravard, A. and Riggs, R.M., **Direct Determination of Cotinine-N-Glucuronide in Urine Using Thermospray Liquid-Chromatography Mass-Spectrometry.** *Biological Mass Spectrometry*, Vol. 23(2), 103-107, 1994
136. Ghosheh, O. and Hawes, E.M., **N-glucuronidation of nicotine and cotinine in human: Formation of cotinine glucuronide in liver microsomes and lack of catalysis by 10 examined UDP-glucuronosyltransferases.** *Drug Metabolism and Disposition*, Vol. 30(9), 991-996, 2002
137. Simons, P.J., Cockshott, I.D., Glen, J.B., Gordon, E.A., Knott, S. and Ruane, R.J., **Disposition and Pharmacology of Propofol Glucuronide Administered Intravenously to Animals.** *Xenobiotica*, Vol. 22(11), 1267-1273, 1992
138. Vree, T.B., deGrood, P.M.R.M., vanBeem, H.B.H. and Booij, L.H.D.J., **Disposition and renal clearance of propofol and its glucuronide metabolites after a short intravenous infusion of propofol.** *Clinical Drug Investigation*, Vol. 13(3), 145-151, 1997
139. Vree, T.B., Lagerwerf, A.J., Bleeker, C.P. and de Grood, P.M.R.M., **Direct high-performance liquid chromatography determination of propofol and its metabolite quinol with their glucuronide conjugates and preliminary pharmacokinetics in plasma and urine of man.** *Journal of Chromatography B*, Vol. 721(2), 217-228, 1999
140. Bleeker, C., Vree, T., Lagerwerf, A. and Bree, E.W.V., **Recovery and long-term renal excretion of propofol, its glucuronide, and two di-isopropylquinol glucuronides after propofol infusion during surgery.** *British Journal of Anaesthesia*, Vol. 101(2), 207-212, 2008
141. Kim, H.S., Cheong, J.C., Lee, J.I. and In, M.K., **Rapid and sensitive determination of propofol glucuronide in hair by liquid chromatography and tandem mass spectrometry.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 85(33-39), 2013
142. Kim, J., In, S., Park, Y., Park, M., Kim, E. and Lee, S., **Quantitative analysis of propofol-glucuronide in hair as a marker for propofol abuse.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 405(21), 6807-6814, 2013
143. Sorensen, L.K. and Hasselstrom, J.B., **Simultaneous determination of propofol and its glucuronide in whole blood by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and the influence of sample storage conditions on the reliability of the test results.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 109(158-163), 2015
144. Dumkow, K., **Kaempferol-3-Glucuronide and Quercetin-3-Glucuronide Main Flavonoids of Euphorbia Lathyris L and Their Separation in Acetylated Polyamide.** *Zeitschrift Fur Naturforschung Part B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie Und Verwandten Gebiete*, Vol. B 24(3), 358-&, 1969
145. Wagner, H., Danninge, H., Seligman, O. and Farkas, L., **Synthesis of Glucuronides in Flavonoid-Series .1. First Synthesis of a Naturally Occurring Flavonoid Glucuronide (Quercetin-3-Beta-Deutrium-Glucuronide).** *Chemische Berichte-Recueil*, Vol. 103(11), 3674-&, 1970
146. Shirai, M., Moon, J.H., Tsushida, T. and Terao, J., **Inhibitory effect of a quercetin metabolite, quercetin 3-O-beta-D-glucuronide, on lipid peroxidation in liposomal membranes.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 49(11), 5602-5608, 2001
147. Fan, D.S., Zhou, X., Zhao, C., Chen, H.G., Zhao, Y. and Gong, X.J., **Anti-inflammatory, antiviral and quantitative study of quercetin-3-O-beta-D-glucuronide in Polygonum perfoliatum L.** *Fitoterapia*, Vol. 82(6), 805-810, 2011

148. Yoshino, S., Hara, A., Sakakibara, H., Kawabata, K., Tokumura, A., Ishisaka, A., Kawai, Y. and Terao, J., **Effect of quercetin and glucuronide metabolites on the monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria**. *Nutrition*, Vol. 27(7-8), 847-852, 2011
149. Juchem, G., Bauer, A., Postrach, J., Reichart, B. and Nees, S., **Quercetin glucuronide preserves cardiac function in porcine hearts during perfusion with human whole blood by inhibiting platelet/neutrophil activation and preserving venular barrier function**. *FASEB Journal*, Vol. 26, 2012
150. Yang, H.H., Hwangbo, K., Zheng, M.S., Cho, J.H., Son, J.K., Kim, H.Y., Baek, S.H., Choi, H.C., Park, S.Y. and Kim, J.R., **Quercetin-3-O-beta-D-glucuronide isolated from Polygonum aviculare inhibits cellular senescence in human primary cells**. *Archives of Pharmacological Research*, Vol. 37(9), 1219-1233, 2014
151. Weissbach, H., Redfield, B.G. and Udenfriend, S., **Serotonin-O-Glucuronide - an Alternate Route of Serotonin Metabolism**. *Federation Proceedings*, Vol. 17(1), 418-418, 1958
152. Suvorov, N.N., Krasavin, L.S., Morozov, L.M., Kostyuch, N.P., Verkhovt, M.I., Liberman, S.S. and Gerchiko, L.N., **Synthesis and Biochemical Identification of O-Glucuronide of Serotonin**. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, Vol. 212(1), 250-253, 1973
153. Suvorov, N.N., Krasavina, L.S., Morozovskaya, L.M., Kostyuchenko, N.P., Verkhovtseva, M.I., Liberman, S.S. and Gerchikov, L.N., **Synthesis and biochemical identification of the O-Glucuronide-Serotonin**. *Doklady Biochemistry*, Vol. 212(1-6), (1974)-(1974), 1973
154. Helander, A., Beck, O. and Boysen, L., **5-Hydroxytryptophol conjugation in man - influence of alcohol-consumption and altered serotonin turnover**. *Life Sciences*, Vol. 56(18), 1529-1534, 1995
155. Stephanson, N., Dahl, H., Helander, A. and Beck, O., **Determination of urinary 5-hydroxytryptophol glucuronide by liquid chromatography-mass spectrometry**. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, Vol. 816(1-2), 107-112, 2005
156. Suominen, T., Uutela, P., Ketola, R.A., Bergquist, J., Hillered, L., Finel, M., Zhang, H.B., Laakso, A. and Kostianen, R., **Determination of Serotonin and Dopamine Metabolites in Human Brain Microdialysis and Cerebrospinal Fluid Samples by UPLC-MS/MS: Discovery of Intact Glucuronide and Sulfate Conjugates**. *Plos One*, Vol. 8(6), 2013
157. Stemmerich, K. Available from:  
[http://absciex.com/Documents/Events/Stemmerich\\_EtG\\_MS3\\_Sciex\\_Berlin.pdf](http://absciex.com/Documents/Events/Stemmerich_EtG_MS3_Sciex_Berlin.pdf)
158. Morini, L., Zucchella, A., Poletti, A., Politi, L. and Groppi, A., **Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair: an in vitro experiment**. *Forensic Science International*, Vol. 198(1-3), 23-27, 2010
159. Kerekes, I. and Yegles, M., **Coloring, Bleaching, and Perming: Influence on EtG Content in Hair**. *Therapeutic Drug Monitoring*, Vol. 35(4), 3, 2012
160. Ammann, D., Becker, R., Kohl, A., Hanisch, J. and Nehls, I., **Degradation of the ethyl glucuronide content in hair by hydrogen peroxide and a non-destructive assay for oxidative hair treatment using infra-red spectroscopy**. *Forensic Science International*, Vol. 244(30-35), 2014
161. Brenner, L., Squires, P.L., Garry, M. and Tumosa, C.S., **A Measurement of Human Hair Oxidation by Fourier Transform Infrared Spectroscopy**. *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 13(2), 9, 1985
162. Carr, C.M. and Lewis, D.M., **An FTIR spectroscopic study of the photodegradation and thermal degradation of wool**. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, Vol. 109(4), 1993
163. Jones, D.C., Carr, C.M., Cooke, W.D. and Lewis, D.M., **Investigating the Photo-Oxidation of Wool Using FT-Raman and FT-IR Spectroscopies**. *Textile Research Journal*, Vol. 68(10), 739-748, 1998
164. Kim, J. and Lewis, D.M., **The effect of various anti-setting systems in wool dyeing. Part 1: Hydrogen peroxide based systems**. *Coloration Technology*, Vol. 118(4), 2002
165. Baddiel, C.B., **Structure and Reactions of Human Hair Keratin: an Analysis by Infrared Spectroscopy**. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 38(19), 1968



166. Zahn, H., **Chemische Vorgaenge beim Bleichen von Wolle und Menschenhaar mit Wasserstoffperoxid und Peroxysaeuren**. Journal of the Society of Cosmetic Chemists, Vol. 17(15), 1966
167. Hopkins, J., Brenner, L. and Tumosa, C.S., **Variation of the Amide-I and Amide-II Peak Absorbency Ratio in Human Hair as Measured by Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy**. Forensic Science International, Vol. 50(1), 61-65, 1991
168. Signori, V. and Lewis, D.M., **FTIR analysis of cysteic acid and cysteine-S-thiosulphate on untreated and bleached human hair**. Macromolecular Symposia, Vol. 119(235-240), 1997
169. Signori, V. and Lewis, D.M., **FTIR investigation of the damage produced on human hair by weathering and bleaching processes: implementation of different sampling techniques and data processing**. International Journal of Cosmetic Science, Vol. 19(1), 1-14, 1997
170. Cappelle, D., Neels, H., Yegles, M., Fransen, E., Dueffels, K., Bremenfeld, S., Maudens, K.E., van Nuijs, A.L.N., Covaci, A. and Crunelle, C.L., **Ethyl glucuronide in nails: method validation, influence of decontamination and pulverization, and particle size evaluation**. Forensic Toxicology, Vol. 34(1), 158-165, 2015
171. Jones, J., Jones, M., Plate, C., Lewis, D., Fendrich, M., Berger, L. and Fuhrmann, D., **Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Assay to Detect Ethyl Glucuronide in Human Fingernail: Comparison to Hair and Gender Differences**. American Journal of Analytical Chemistry, Vol. 03(01), 83-91, 2012
172. Keten, A., Zeren, C., Arslan, M.M., Daglioglu, N., Karanfil, R. and Sen, B.B., **Determination of ethyl glucuronide in fingernails by LC/MS-MS**. Romanian Journal of Legal Medicine, Vol. 21(1), 67-72, 2013
173. Morini, L., Colucci, M., Ruberto, M.G. and Groppi, A., **Determination of ethyl glucuronide in nails by liquid chromatography tandem mass spectrometry as a potential new biomarker for chronic alcohol abuse and binge drinking behavior**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 402(5), 1865-1870, 2012
174. Ammann, D., Becker, R., Kohl, A. and Nehls, I., **Alcohol consumption marker in hair: Impact and detection of cosmetic bleaching**. 9. Interdisziplinäres Doktorandenseminar, 2015
175. Becker, R., Ammann, D., Kohl, A. and Nehls, I., **Degradation of Ethyl glucuronide by hydrogen peroxide and a non-destructive assay for oxidative hair treatment using infra-red spectroscopy**. 19th Meeting of the Society of Hair Testing, Vol. 2014

## Anhang

### A-1 Bestimmung von EtG mittels HPLC-MS/MS durch alternative Trennsysteme

Alternativ zur flüssig-chromatografischen Trennung von EtG von Matrixbestandteilen in Haarextrakten nach der Methode in Kapitel 3.3.4 sollen hier Trennmethoden auf Normalphasen und Reversed-Phase-Säulen (RP) vorgestellt werden. Motivation war die Reduktion der hohen Kosten der verwendeten Hypercarb-Säulen, da diese hohem Verschleiß unterlagen (Tabelle 35). Die Trennung war durchaus möglich, es konnten sogar schärfere und somit höhere Signale als bei der vorgestellten Hypercarb-Methode erhalten werden. Jedoch standen dem deutlich besseren Signal-Rausch-Verhältnis auf Reversed-Phase-Säulen ein bislang unkontrollierbares Maß an Ionensuppression gegenüber, was eine Quantifizierung gegen eine Lösemittelkalibrierung unverlässlich machte. Auf der getesteten Normalphasensäule konnte EtG nicht zur Retention gebracht werden.

Tabelle 35: Wechselintervalle und jährliche Kosten: Thermo Fisher Hypercarb® Vorsäulen und analytische Säulen

<i>Säule</i>	<i>Kosten, Stand Februar 2016, VWR</i>	<i>Wechselintervall</i>	<i>Kosten pro Jahr</i>
Thermo Fisher Hypercarb®, Analytische Säule 100 × 2,1 mm × 3 µm	1020,00 €	6 Monate	2040,00 €
Thermo Fisher Hypercarb®, Vorsäule 10 × 2,1 mm × 3 µm	170,50 €	1 Monat	2046,00 €
<b>Gesamtkosten jährlich</b>			<b>4086,00 €</b>

### Bestimmung von EtG nach Trennung auf Phenomenex Kinetex® HILIC

Erste Versuche erfolgten mit einer HILIC-Säule. Diese Art von Säulen ist im Gegensatz zu RP-Säulen gut zur Trennung von polaren Substanzen geeignet. Eine weitere Besonderheit dieses Säulenmaterials ist der sog. *Coreshell*-Aufbau. Die sphärischen Partikel des Säulenmaterials sind aus einem festen Kern aufgebaut, auf den ein poröser Mantel aufgebracht ist. Dies soll gleichzeitig Retentionszeiten verkürzen, aber auch durch kürzere Diffusionswege die Auflösung verbessern. Abbildung 51 zeigt den Aufbau der *Coreshell*-Materialien im Vergleich zu vollporösen Partikeln. Der strukturelle Aufbau der Phasenoberfläche ist in Abbildung 52 dargestellt.

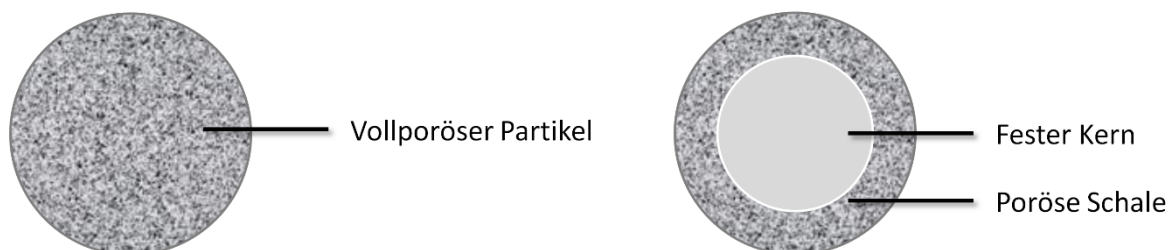


Abbildung 51: Gegenüberstellung des Aufbaus von vollporösen und *Coreshell*®-Partikeln

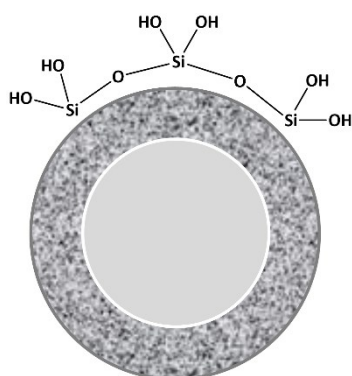


Abbildung 52: Strukturausschnitt der HILIC-Phasenoberfläche

Bei HILIC-Säulen verhält sich die Reihenfolge der Elutionskraft von Lösemitteln umgekehrt zu denen der auf RP-Phasen. Nach einigen Vorversuchen konnte ein scharfes EtG-Signal im MRM-Modus aufgezeichnet werden (MS-Bedingungen siehe 3.3.4). Das Fließmittel bestand aus 90 Vol-% Acetonitril in Wasser mit Zusatz von 0,1 Vol-% Ameisensäure. Der Fluss lag bei konstant 300 L/min. Die injizierte Probe (500 ng/mL EtG in 90 Vol-% Acetonitril, Injektionsvolumen: 1 µL) erzeugte das in Abbildung 53 dargestellte Chromatogramm.

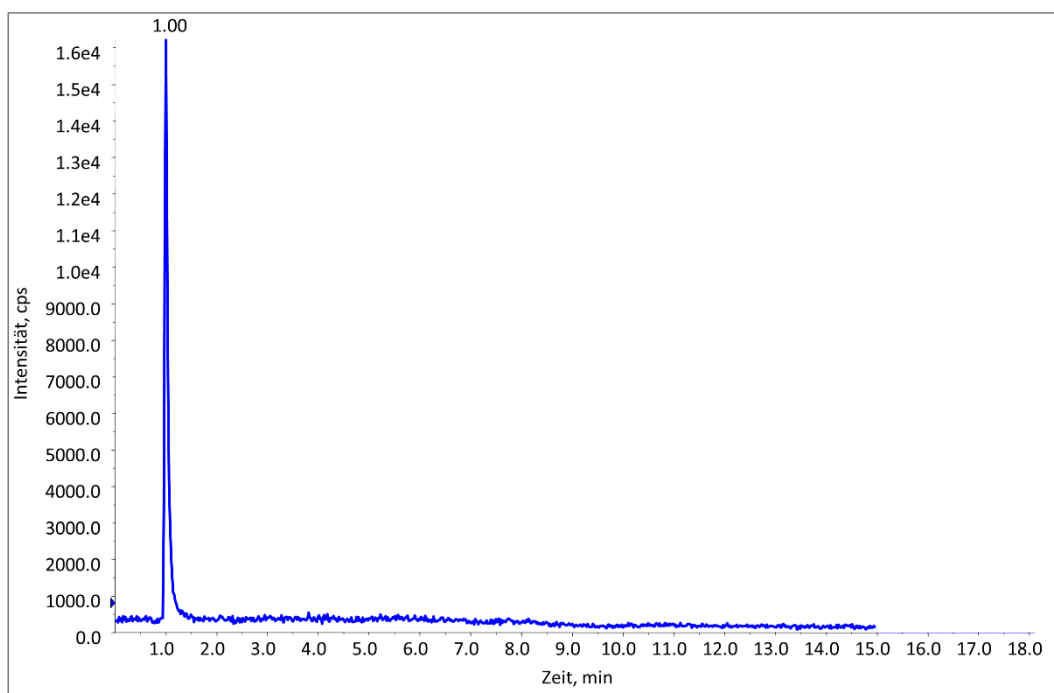


Abbildung 53: Chromatogramm von 1 µL einer 500 ng/mL EtG-Lösung in 90 % ACN auf Phenomenex Kinetex® HILIC; Detektion im MRM-Modus

Auffällig war jedoch die sehr kurze Retentionszeit von nur einer Minute, selbst für *Coreshell*-Materialien, bei denen generell kurze Retentionszeiten durch die Verringerung der Säulenoberfläche zustande kommen. Die Vermutung lag nahe, dass die Substanz in der Totzeit eluiert. Die Injektion von 50 µL Luft führte zu einem sichtbaren Intensitätsverlust bei einer Retentionszeit von einer Minute. Somit galt die Vermutung, EtG eluiert in der Totzeit als nachgewiesen.

Letztendlich war es nicht möglich, EtG zur Retention auf der vorgestellten Säule zu bringen. Somit war die Säule zur Bestimmung von EtG ungeeignet.

## Bestimmung von EtG nach Trennung auf Synergi® Hydro-RP

Die Phenomenex Synergi® Hydro-RP ist eine *Reversed-Phase* C<sub>18</sub>-Säule mit erhöhtem Retentionsverhalten für polare Analyten. Dies wird durch polares *endcapping* der Silanol-Gruppen erreicht (Abbildung 54).

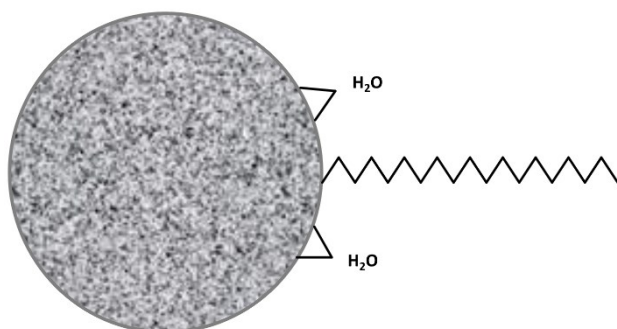


Abbildung 54: Strukturausschnitt der Hydro-RP C<sub>18</sub>-Phasenoberfläche

Die Partikel waren vollporös im Gegensatz zu denen bei der HILIC-Phase. Dadurch verlängerte sich die Retentionszeit im Vergleich zu *Coreshell*®-Materialien, da pro Masseneinheit Säulenpartikel mehr Adsorptionsfläche zur Verfügung stand.

50 µL Haarextrakt (10,8 EtG und 99,3 pg/mg EtG-d5 in wässriger Lösung) wurden unter Verwendung von analytischer Säule #2: Synergi® Hydro-RP in das beschriebene HPLC-MS/MS-System injiziert (Kapitel 3.3.4). Die Säulentemperatur betrug konstant 30 °C. Beim Fließmittel handelt es sich um ein sich graduell veränderndes Gemisch von Wasser und Acetonitril jeweils mit einem Zusatz von 0,1 % Ameisensäure. Das LC-Programm lautet wie folgt:

Zeit (min)	Flussrate (µL/min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0.00	300	95	5
3.00		95	5
4.00		20	80
5.00		20	80
5.01		95	5
11.00		95	5

Tabelle 36: Kenndaten zur Analyse von EtG mittels HPLC-MS/MS auf Synergi® Hydro-RP MRM-Modus; Optimierte MS-Parameter; fett: Quantifizier-Übergang)

ESI <sup>⊖</sup> Parameter	CUR (a.u.)	CAD (a.u.)	IS (V)	TEM (°C)	GS1 (a.u.)	GS2 (a.u.)	ihe	
	25	12	-3400	500	90	90	an	
	Analyt	Q1	Q3	Dwell time (ms)	DP	EP	CE	CXP
Massen- übergänge	EtG	221,071	<b>74,9</b>	100	-46	-6	-24	-6
			84,9		-48	-4	-25	-6
	EtG- <i>d</i> <sub>5</sub>	225,979	<b>74,9</b>		-54	-5	-23	-6
			85,0		-49	-7	-24	-6

CUR curtain gas, CAD collision activated dissociation gas, IS ion spray voltage, TEM desolvation temperature, GS1 ion source gas 1 flow, GS2 ion source gas 2 flow, ihe interface heater, Q1 Quadrupol 1, Q3 Quadrupol 3, DP declustering potential, EP entrance potential, CE collision energy, CXP cell exit potential

Da es sich bei dieser Säule um eine 100 % wasserstabile Phase handelt, wurde im ersten Versuch auf Acetonitril als Fließmittel verzichtet. Die Retentionszeit von EtG betrug 7,25 min und die des internen Standards 7,08 min (Abbildung 55). Gemessen an der Polarität von EtG können die erhaltenen Retentionszeiten auf der vorgestellten RP als außerordentlich lang angesehen werden. Dies kommt nicht zuletzt durch polares *endcapping* (s.o.) zustande.

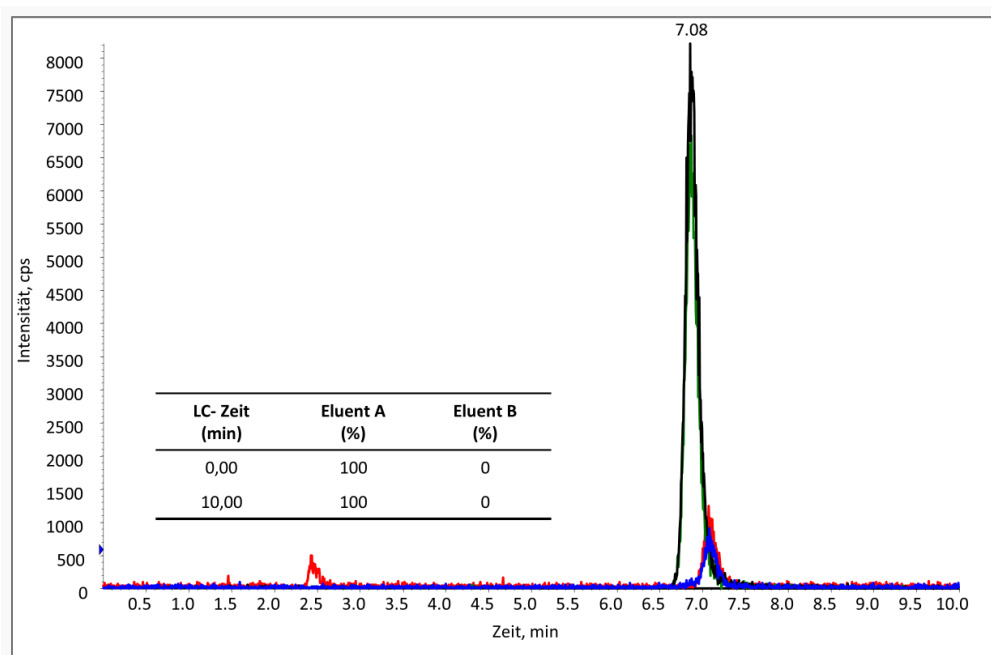


Abbildung 55: Chromatogramm einer EtG/EtG- $d_5$ -Lösung auf Phenomenex Synergi® Hydro-RP 100 % Eluent A; Detektion im MRM-Modus; blau/rot: Übergänge EtG; grün/grau: Übergänge EtG- $d_5$

Nach mehreren Versuchen, entstand das oben aufgeführte LC-Programm. Eine Realprobe (Mikropulverisierung von HP-3) lieferte das Chromatogramm in Abbildung 56.

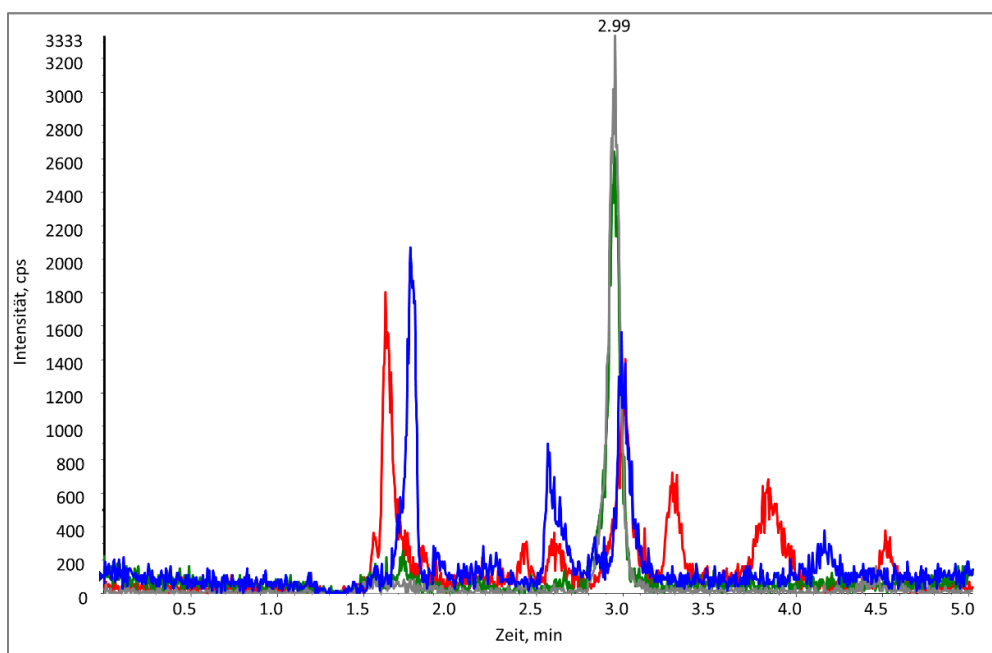


Abbildung 56: Chromatogramm von 50 µL eines HP-3-Extraktes auf Phenomenex Synergi® Hydro-RP blau/rot: Übergänge EtG; grün/grau: Übergänge EtG- $d_5$

Zum Vergleich ein Chromatogramm der gleichen Haarproben HP-3, wie es mit Hilfe des validierten HPLC-MS/MS-Verfahrens erhalten wurde (Abbildung 57).

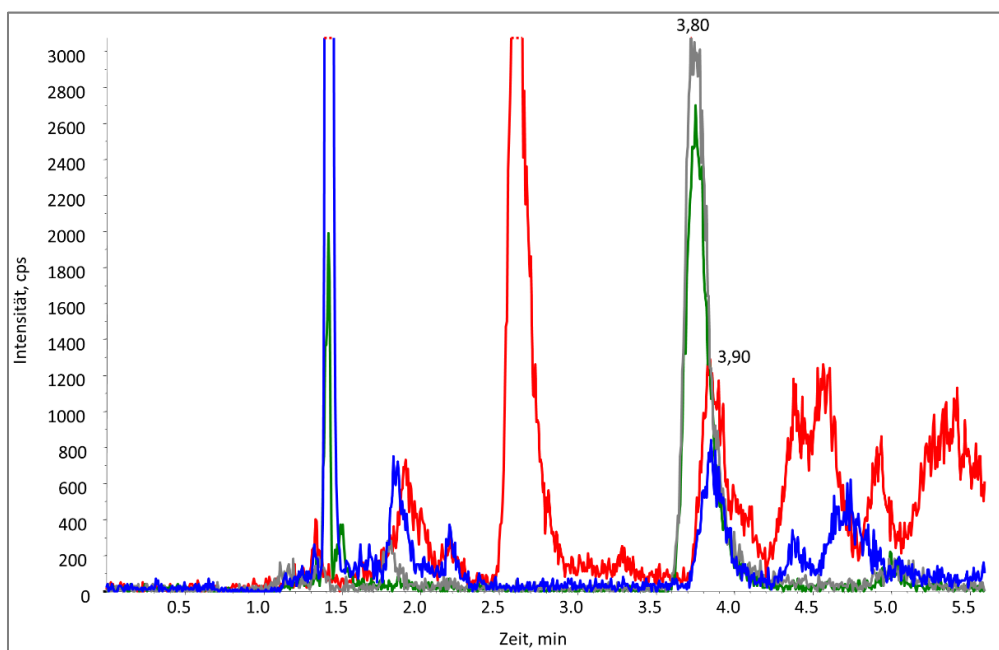


Abbildung 57: Chromatogramm von 50 µL eines HP-3-Extraktes auf Thermo Fisher Hypercarb® blau/rot: Übergänge EtG; grün/grau: Übergänge EtG- $d_5$

Während das Hypercarb-Verfahren (Kapitel 3.3.4) absolut valide Werte lieferte, welche sogar durch Ringversuche und die Analyse eines externen Referenzmaterials abgedeckt sind (Kapitel 4.2.3), konnte diese Validität für die aktuell entwickelte Methode nicht bestätigt werden. Obwohl eine Lösemittelkalibrierung (Abbildung 58) von 3 bis 850 pg/mg EtG einen hohen Korrelationskoeffizienten aufweist ( $R^2 = 0,9992$ ), scheint die Probenmatrix einen massiven Einfluss auf die Richtigkeit der Bestimmung zu nehmen. Dies verdeutlicht Tabelle 37, die Ergebnisse in Dreifachinjektion von je sieben separaten Extraktionen des Materials HP-3 und ESM-5 gegenüberstellt.

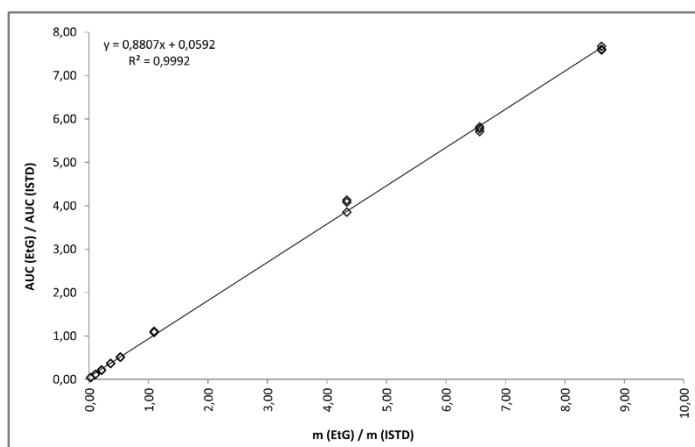


Abbildung 58: 9-Punkt-Kalibrierung zur Detektion von EtG auf Phenomenex Synergi® Hydro-RP 2,8 pg/mg bis 849,2 pg/mg;  $R^2 = 0,9992$

Tabelle 37: Ergebnisse der EtG-Bestimmung der Haarmaterialien *HP-3* und *ESM-5*  
Sieben Wiederholbestimmungen in Dreifachinjektion

<i>Haarprobe</i>	<i>EtG-Gehalt je Injektion (pg/mg)</i>	<i>Haarprobe</i>	<i>EtG-Gehalt je Injektion (pg/mg)</i>
	62,6		524,2
<i>HP-3-1</i>	63,9	<i>ESM-5-1</i>	522,5
	96,9		404,0
	91,8		582,5
<i>HP-3-2</i>	94,4	<i>ESM-5-2</i>	691,2
	65,1		n.a.
	66,4		585,8
<i>HP-3-3</i>	73,7	<i>ESM-5-3</i>	654,4
	76,6		n.a.
	68,1		402,8
<i>HP-3-4</i>	66,2	<i>ESM-5-4</i>	400,1
	52,0		314,5
	69,1		499,2
<i>HP-3-5</i>	69,3	<i>ESM-5-5</i>	549,3
	96,6		431,8
	68,1		544,7
<i>HP-3-6</i>	67,5	<i>ESM-5-6</i>	320,7
	64,6		n.a.
	68,8		681,4
<i>HP-3-7</i>	69,6	<i>ESM-5-7</i>	569,5
	95,2		n.a.
<b>Mittelwert</b>	<b>73,6 ± 13,1</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>510,5 ± 116,1</b>
<b>Referenz</b> Kapitel 3.3.4	<b>22,4 ± 1,0</b>	<b>Referenz</b> Kapitel 3.3.4	<b>640,8 ± 76,6</b>

n.a.: Ergebnisse konnten aufgrund von Matrixinteraktionen mit den entsprechenden Signalen für EtG und EtG-*d*<sub>5</sub> nicht bestimmt werden; Signale waren nicht eindeutig identifizierbar

Es war sichtlich nicht möglich, die Referenzwerte (Kapitel 3.3.4) für HP-3 und ESM-5 zu reproduzieren. Im Falle von HP-3 wurde im Mittel fast die dreifache EtG-Menge detektiert, wie durch das Referenzverfahren.

Für das Haarmaterial HP-3 waren die Analysenergebnisse deutlich höher (73,6 pg/mg vs. 22,4 pg/mg), als die entsprechenden Referenzwerte. Für ESM-5 lagen die Ergebnisse niedriger. Von insgesamt 21 Injektionen konnten vier Chromatogramme nicht ausgewertet werden, da die Signale von Analyt bzw. internem Standard in Matrix zu sehr überlagerten.

Durch diesen Sachverhalt kann das Synergi®-Hydro-RP-Verfahren nicht routinemäßig für die Detektion von EtG in der Haarmatrix eingesetzt werden. Die Gefahr zur Falschdetektion von EtG ist zu hoch.

#### **Bestimmung von EtG nach Trennung auf Waters XTerra® Phenyl**

Der Versuch, EtG auf einer RP-Säule von der Haarmatrix zu trennen, wurde auf einer Waters XTerra® Phenyl-Phase mit den Dimensionen 150 × 3,9 mm × 3,5 µm unternommen. Da von Turfus et al. [41] bereits ein validiertes Verfahren für die Detektion von EtG aus Haaren unter Verwendung dieser Säule

beschrieben wurde, sollte diese Methode auf das vorhandene LC-MS/MS-System übertragen und optimiert werden.

Die stationäre Phase der RP-Säule ist mit phenolischen Gruppen funktionalisiert (Abbildung 59). Diese bieten erhöhte Selektivität für Analyten mit phenolischen Teilstrukturen, jedoch liegt die Besonderheit bei dieser Säule in der Verträglichkeit von 100 % wässrigem Eluenten. Unter diesen Bedingungen kann auch eine gewisse Selektivität für polare Analyten vorhanden sein.

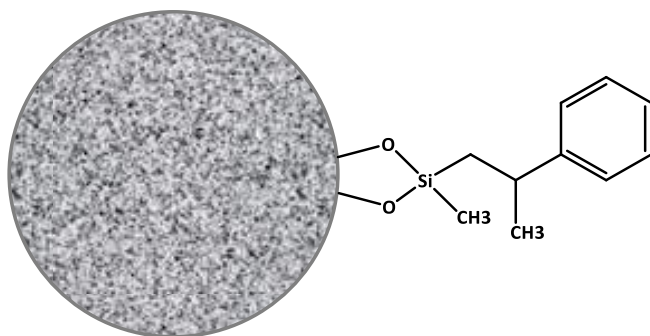


Abbildung 59: Strukturausschnitt der XTerra Phenyl-Phasenoberfläche

50 µL Haarextrakt wurden unter Verwendung von analytischer Säule #3: Waters XTerra®-Phenyl in das beschriebene HPLC-MS/MS-System injiziert (Kapitel 3.1). Die Säulentemperatur betrug konstant 35 °C. Beim Fließmittel handelt es sich um ein sich graduell veränderndes Gemisch von Wasser und Acetonitril, jeweils mit einem Zusatz von 0,1 Vol-% Ameisensäure. Das LC-Programm lautet wie folgt, die MS-Parameter sind in Tabelle 38 dargestellt.

Zeit (min)	Flussrate (µL/min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0.00	300	93	7
4.00		93	7
6.00		0	100
7.00		0	100
7.50		93	7
10.00		93	7

Tabelle 38: Kenndaten zur Analyse von EtG mittels HPLC-MS/MS auf Waters XTerra®-Phenyl MRM-Modus; Optimierte MS-Parameter; fett: Quantifizier-Übergang)

Viktor: Modus, Optimierte MS Parameter, Vekt. Quantifiz. Übergang,								
ESI <sup>+</sup> Parameter	CUR (a.u.)	CAD (a.u.)	IS (V)	TEM (°C)	GS1 (a.u.)	GS2 (a.u.)	ihe	
	25	12	-4500	500	90	80	an	
	Analyt	Q1	Q3	Dwell time (ms)	DP	EP	CE	CXP
Massen- übergänge	EtG	221,071	74,9	100	-46	-6	-24	-6
			84,9		-48	-4	-25	-6
	EtG-d <sub>5</sub>	225,979	74,9		-54	-5	-23	-6
			85,0		-49	-7	-24	-6

CUR curtain gas, CAD collision activated dissociation gas, IS ion spray voltage, TEM desolvation temperature, GS1 ion source gas 1 flow, GS2 ion source gas 2 flow, ihe interface heater, Q1 Quadrupol 1, Q3 Quadrupol 3, DP declustering potential, EP entrance potential, CE collision energy, CXP cell exit potential



Da das Säulenmaterial 100 % wasserstabil war, fand ein erster Versuch zur Trennung von EtG von Matrixbestandteilen isokratisch in rein wässrigem Eluenten statt (Abbildung 60). Der injizierte wässrige Standard enthielt 150,1 pg/mg EtG und 97,0 pg/mg EtG- $d_5$ .

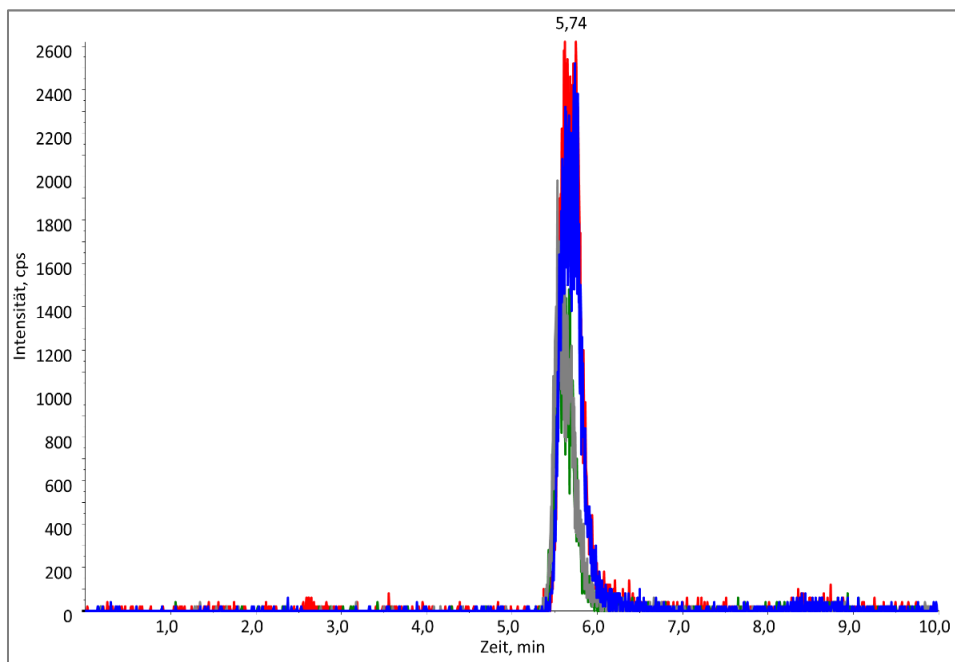


Abbildung 60: Chromatogramm einer EtG/EtG- $d_5$ -Lösung auf Waters XTerra Phenyl 100 % wässrig; Detektion im MRM-Modus; blau/rot: Übergänge EtG; grün/grau: Übergänge EtG- $d_5$

Durch iteratives Zumischen von Acetonitril zur wässrigen Phase konnten letztendlich die zu Beginn des Kapitels optimalen Fließmittelbedingungen hergestellt werden. Das Chromatogramm zeigt einen scharf begrenzten Peak für EtG und einen für den internen Standard (Standard-Lösung, Abbildung 61).

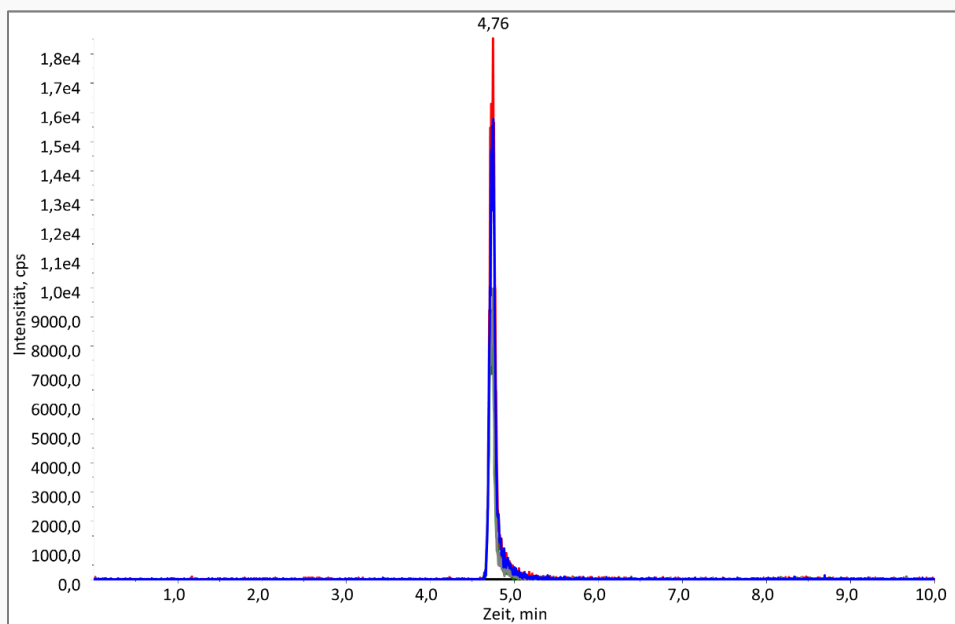


Abbildung 61: Chromatogramm einer EtG/EtG- $d_5$ -Lösung auf Waters XTerra Phenyl Finales LC-Programm; Detektion im MRM-Modus; blau/rot: Übergänge EtG; grün/grau: Übergänge EtG- $d_5$

Eine Injektion eines Extraktes des Materials HP-5-w zeigte jedoch starke Matrixeinflüsse auf die Signale von EtG und EtG- $d_5$  (Abbildung 62). Ebenso lagen die erreichten Intensitäten des internen Standards deutlich unter denen im wässrigen Standard (ca. 1/10: 10000 cps vs. 900 cps). Aufgrund fehlender Basislinientrennung zu den in der Nähe eluierenden Matrixbestandteilen musste mit Störungen bei der Quantifizierung der Signale gerechnet werden.

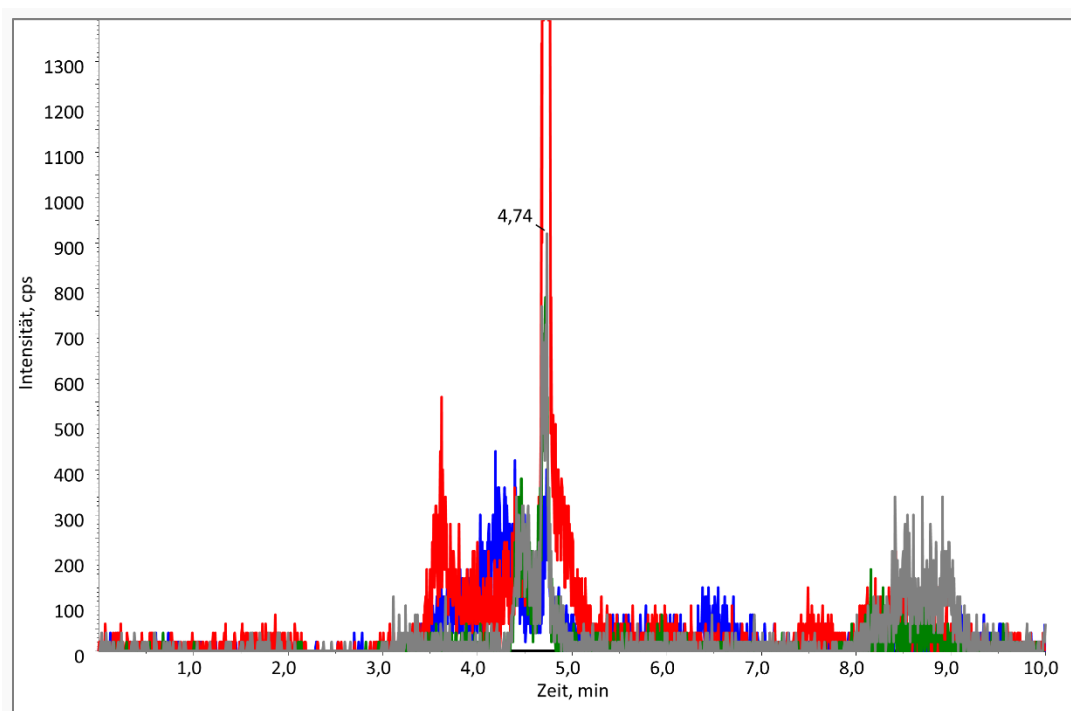


Abbildung 62: Chromatogramm von 50  $\mu$ L eines HP-5-w-Extraktes auf Waters XTerra Phenyl blau/rot: Übergänge EtG; grün/grau: Übergänge EtG- $d_5$

Um eine abschließende Beurteilung zur Eignung der Phase trotz verminderter Signalintensität treffen zu können, wurden Extrakte von sechs Haarmaterialien durch Mikropulverisierung hergestellt und je einmal auf der XTerra Phenyl-Säule getrennt und einmal auf der Hypercarb-Säule, wie in Kapitel 3.3.4 dargestellt (Tabelle 39).

Tabelle 39: EtG-Messwerte im Vergleich: Waters XTerra® Phenyl und Thermo Fisher Hypercarb®

<i>Haarmaterial</i>	<i>XTerra Phenyl pg/mg</i>	<i>Hypercarb pg/mg</i>	<i>Prozentuale Abweichung</i>
ESM-6	19,8	1,6	1137,5
ESM-7	22,2	5,2	326,9
HP-1	26,5	13,8	92,0
HP-2	125,2	22,1	466,5
HP-4-w	27,0	19,4	39,2
HP-5-w	31,2	24,6	26,8

In keinem Fall konnte mit einer der Methoden auf der Phenyl-Phase auch nur annäherungsweise der EtG-Gehalt, wie er unter Verwendung des validierten HPLC-Verfahrens nach Trennung auf einer Hypercarb-Säule erhalten wird, reproduziert werden. Die Phase war somit ungeeignet zur Bestimmung von EtG aus der Haarmatrix.

## A-2 Einzelmesswerte aller Haarmaterialien von der Firma Medichem Diagnostica

Einige der auf Homogenität untersuchten Medichem-Materialien wurden in den SoHT-Ringversuchen zwischen 2012 und 2014 ausgegeben. Da die Materialnamen später nicht in den Ringversuchen auftauchten, war es auch für uns nicht nachvollziehbar, welche Materialien genau ausgeliefert wurden. Tabelle 40 zeigt die Einzelergebnisse der Homogenitätsuntersuchungen der Materialien 1 bis 6.

Tabelle 40: Auflistung aller erhaltener Einzelergebnisse der Medichem-Materialien 1 bis 6

<b>Haarmaterial</b>						
<i>Medichem-1</i>	<i>Medichem-2</i>	<i>Medichem-3</i>	<i>Medichem-4</i>	<i>Medichem-5</i>	<i>Medichem-6</i>	
70,3	36,1	52,9	5,9	19,5	24,5	
72,7	45,2	50,5	5,7	23,9	27,5	
66,2	46,5	50,9	5,6	21,8	23,4	
70,7	40,5	43,5	7,3	22,9	23,5	
69,7	42,0	51,7	4,6	20,7	19,0	
71,2	42,8	49,7	7,6	20,4	27,9	
70,0	43,5	48,0	6,4	20,4	22,9	
77,1	40,6	48,3	7,1	21,5	25,9	
67,8	45,0	51,6	7,8	19,9	25,7	
70,6	39,9	44,1		17,1	27,2	
71,3	50,2	50,1		19,2	26,9	
68,5	42,1	43,5		21,2	25,1	
68,2	54,4	47,7		20,5	26,8	
71,2	36,4	47,3		21,9	28,3	
69,4	44,7	47,2		24,2	26,0	
70,9	35,9	48,9		22,8	23,9	
71,6	42,4	50,8		21,2	22,8	
69,6	44,2	45,4		24,0	24,5	
70,6	41,1	47,1		22,7	23,7	
70,7	44,1	50,7		22,1	26,3	
71,4	43,2					
72,7	34,4					
73,1	42,2					
72,0	39,6					
67,6	43,0					
71,9	35,6					
<b>70,6</b>	<b>42,2</b>	<b>48,5</b>	<b>6,5</b>	<b>21,5</b>	<b>25,1</b>	<b>Mittelwert</b>
26	26	20	9	20	20	n
2,1	4,5	2,8	1,1	2,3	3,4	SD
3,0	10,6	5,8	17,0	10,8	13,7	RSD

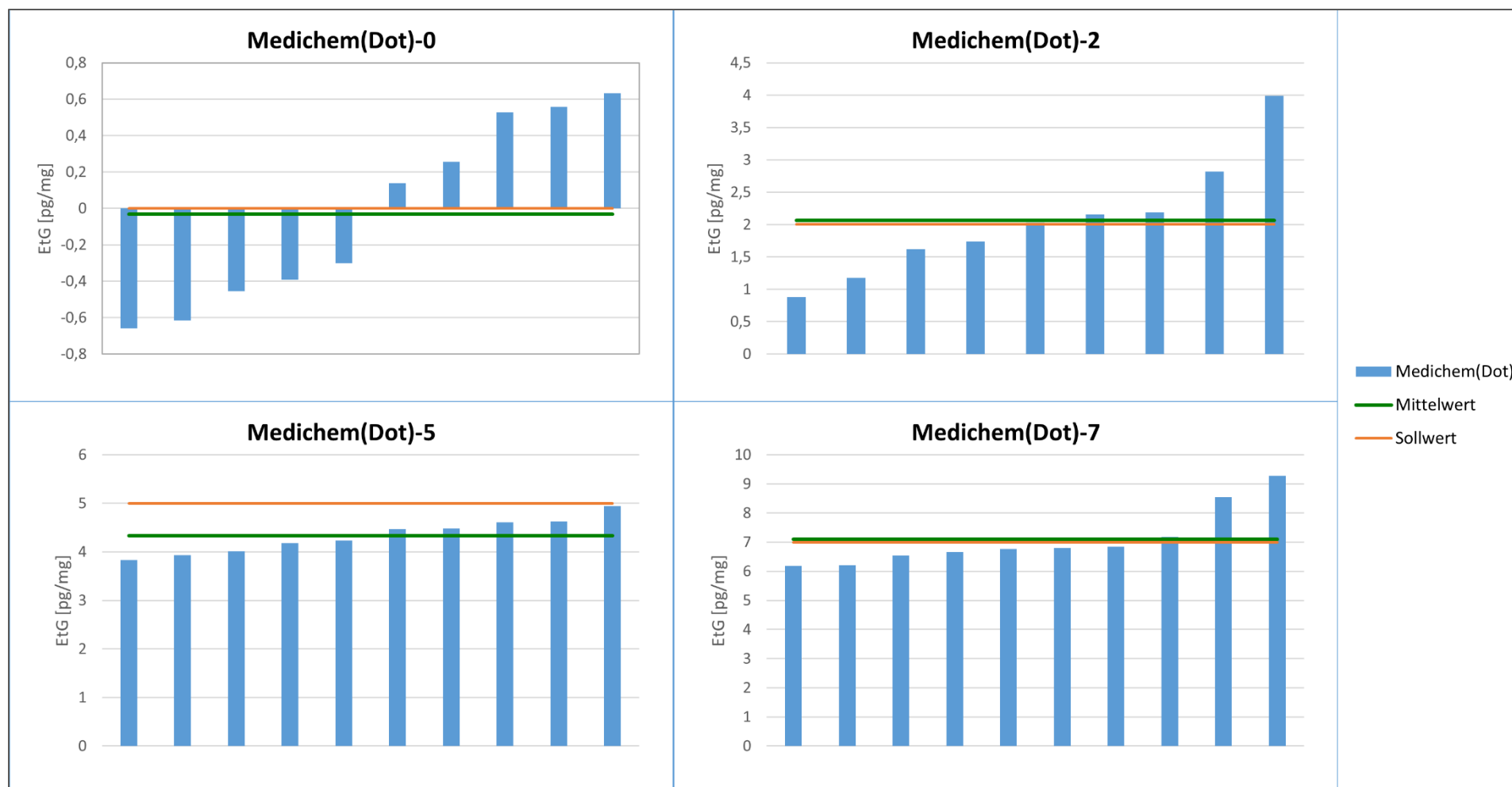


Abbildung 63: Einzelergebnisse der Homogenitätsstudien dotierter Medichem-Materialien (1/3)  
 Medichem(Dot)-0, Medichem(Dot)-2, Medichem(Dot)-5, Medichem(Dot)-7; Erhaltene Messwerte, errechnete Mittelwerte, Sollwerte; *Medichem(Dot)-0* < LOD;  
*Medichem(Dot)-2* < LOQ

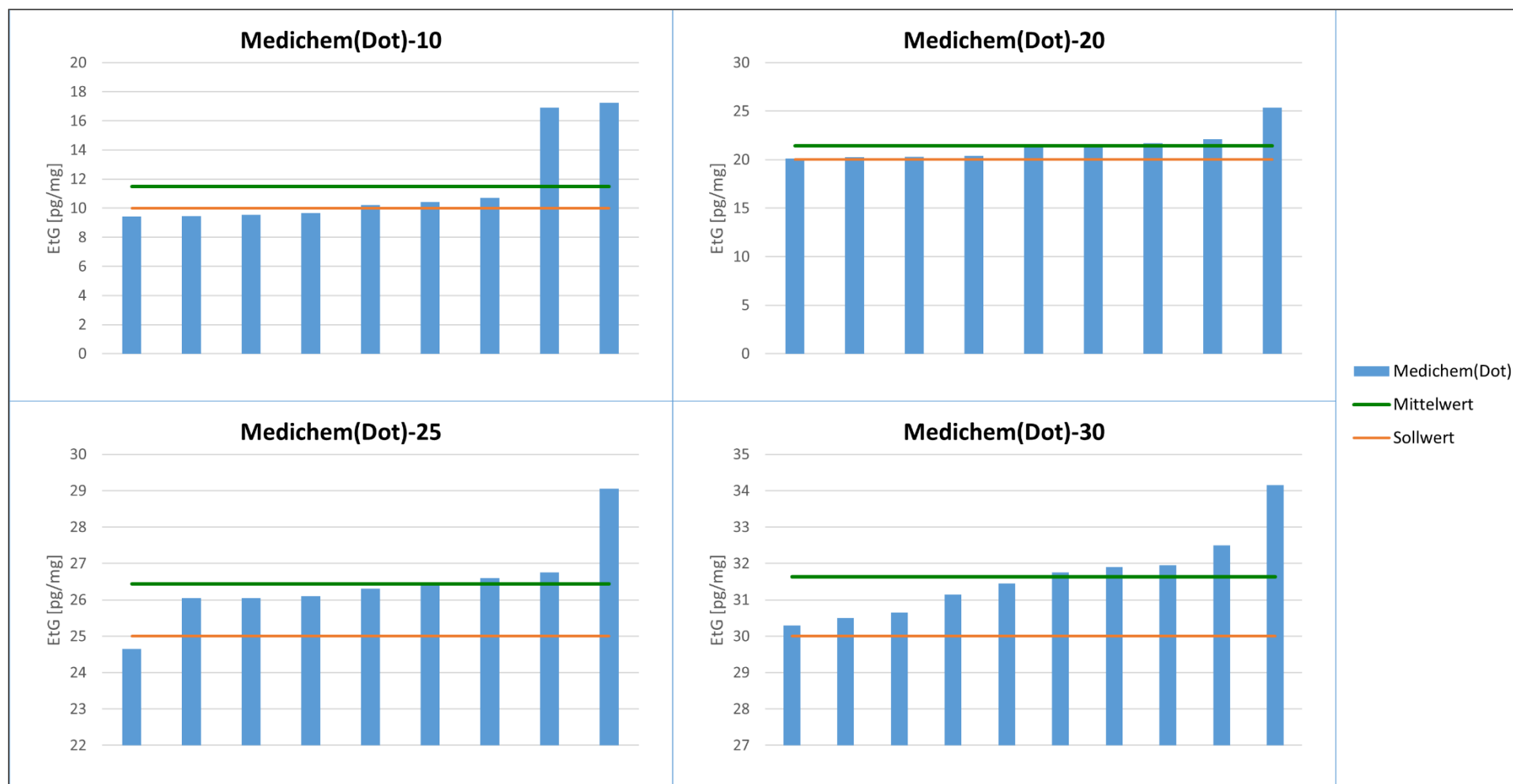


Abbildung 64: Einzelergebnisse der Homogenitätsstudien dotierter Medichem-Materialien (2/3)  
 Medichem(Dot)-10, Medichem(Dot)-20, Medichem(Dot)-25, Medichem(Dot)-30; Erhaltene Messwerte, errechnete Mittelwerte, Sollwerte

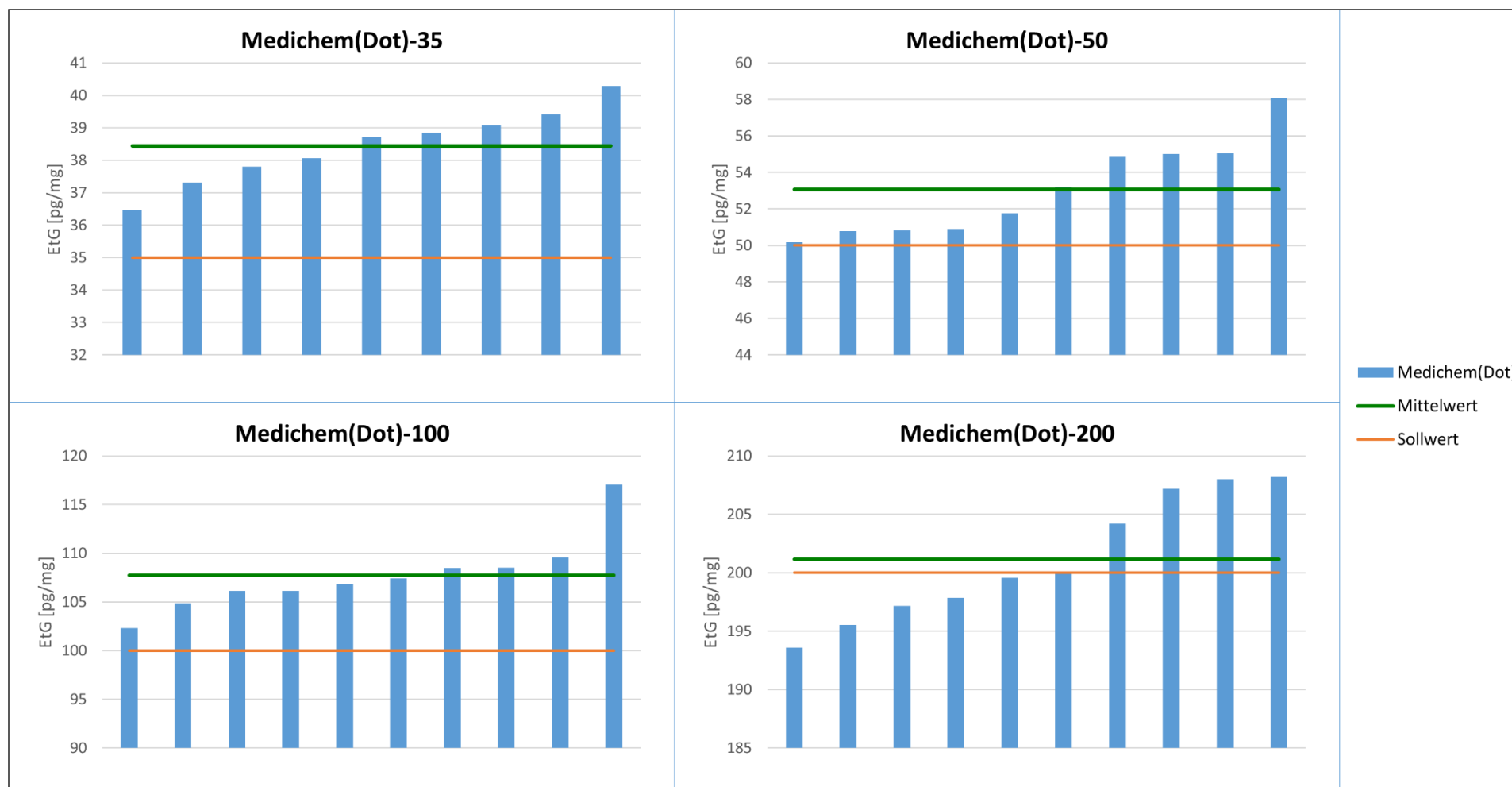


Abbildung 65: Einzelergebnisse der Homogenitätsstudien dotierter Medichem-Materialien (3/3)  
 Medichem(Dot)-35, Medichem(Dot)-50, Medichem(Dot)-100, Medichem(Dot)-200; Erhaltene Messwerte, errechnete Mittelwerte, Sollwerte

### A-3 Rasterelektronenmikroskopie von Haaren - intakt und gemahlen

Um den Effekt des Mahlens auf die Struktur von menschlichem Kopfhaar zu beurteilen, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) von natürlich belassenen Haaren sowie von trocken und nass gemahlenen Haaren angefertigt. Es handelte sich dabei um charakteristische Beispiele. Das Experiment sollte klären, wie die Haarstruktur verändert wird, da aus gemahlenen Haaren mehr EtG extrahierbar ist, als aus geschnittenen Haaren [83, 97]. Alle Aufnahmen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop *Zeiss Gemini Supra 40* angefertigt. Eine Bedampfung der hergestellten Proben mit Gold war wegen starker elektrostatischer Aufladungseffekte notwendig. Die Mahlung erfolgte unter Verwendung einer *Retsch Schwingmühle MM400* durchgeführt unter Verwendung von  $2 \times 5$  mm Stahlkugeln bei 30 Schwingungen pro Sekunde. Die Masse der eingesetzten Haarmaterialien betrug bei Trocken- und Nassmahlung je 50 mg. Das Material HP-3 wurde aufbereitet (Tabelle 41) und die entstandenen Strukturen mittels Rasterelektronenmikroskopie vergrößert dargestellt.

Tabelle 41: Herstellung vorbehandelter Haarproben (HP-3) zur Anfertigung von REM-Aufnahmen

	<i>Mahlgefäße</i>	<i>Zeit (min)</i>	<i>Modus</i>
nicht-gemahlen	-	-	-
Probe 1	5-mL Edelstahlbecher	10	Trocken, RT
Probe 2			Trocken, flüssiger Stickstoff
Probe 3	2-mL Eppendorf-Tubes	30	Nass, 500 µL Wasser, Gefriertrocknung

Die folgenden Seiten zeigen in Abbildung 66 bis Abbildung 70 eine Zusammenstellung der erhaltenen rastermikroskopischen Aufnahmen mit entsprechenden Erläuterungen.

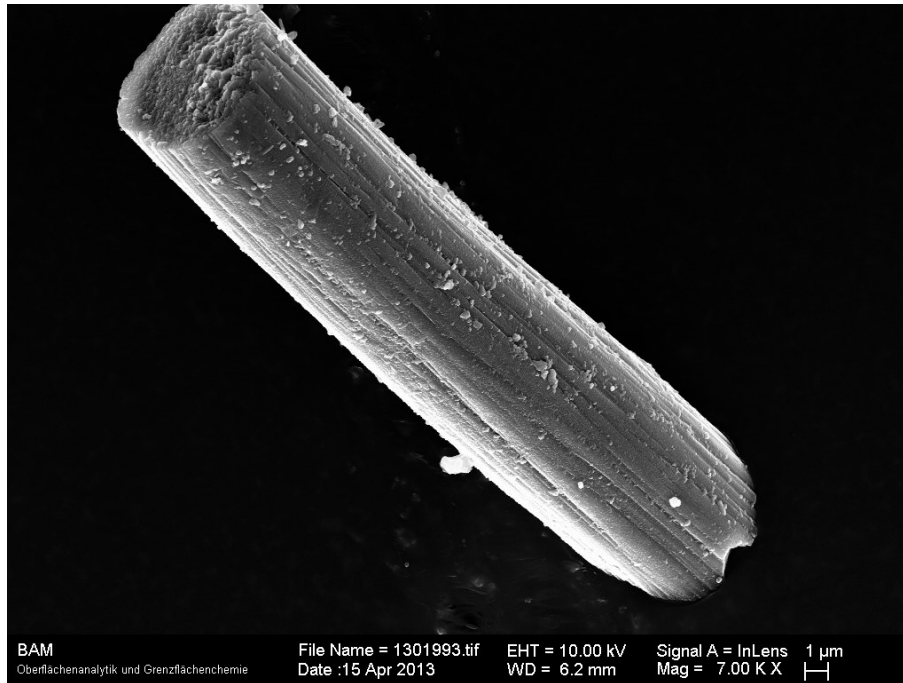


Abbildung 66: REM-Aufnahme der nicht-gemahlene Haarprobe; 7000-fache Vergrößerung

Die Abbildung zeigt die nicht-gemahlene Haarprobe in 7000-facher Vergrößerung. Gut zu erkennen: die intakte Haaroberfläche und an den Schnittflächen die Makrofibrillen, aus denen das Haar zusammengesetzt ist (siehe Kapitel 1.3, Abbildung 3).

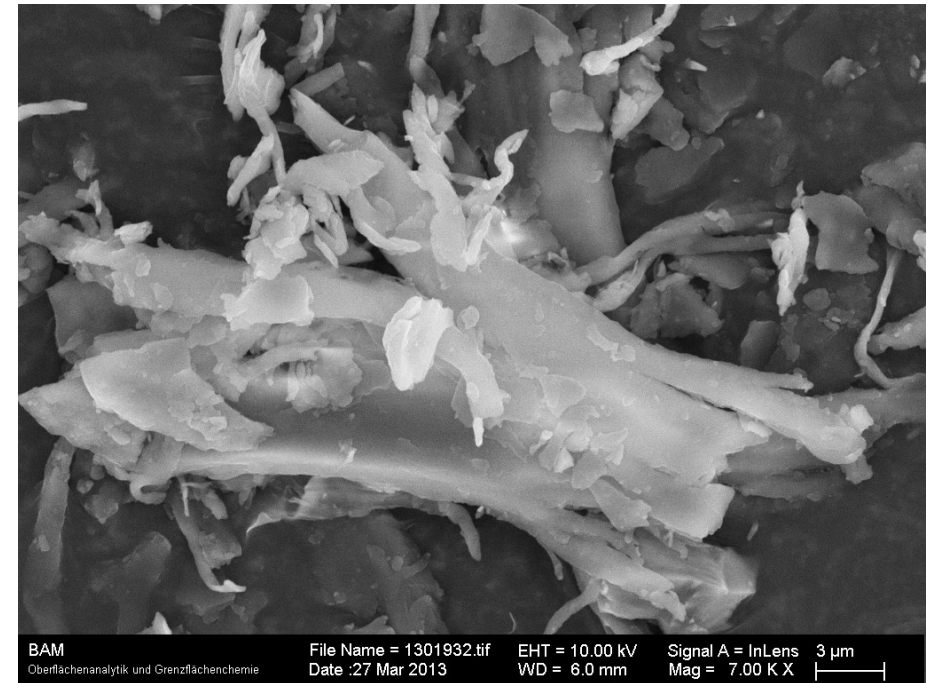


Abbildung 67: REM-Aufnahme der Haarprobe 1 (Trockenmahlung bei Raumtemperatur); 7000-fache Vergrößerung

Im 5-mL-Edelstahlbecher bei Raumtemperatur gemahlene Haare zeigen jedoch ein ganz anderes Bild (Abbildung 67). Die Grundstruktur wurde vollständig zerstört. Zu erkennen waren größere Bruchstücke und kleine Fragmente im Mikrometerbereich.

Durch die Mahlung ist das Innere des Haares leichter für Lösemittel zugänglich und die Extraktionsausbeute steigt. Diesen Effekt macht man sich zu Nutze, um höhere EtG-Ausbeuten zu erzielen [83, 97, 107, 174, 175].



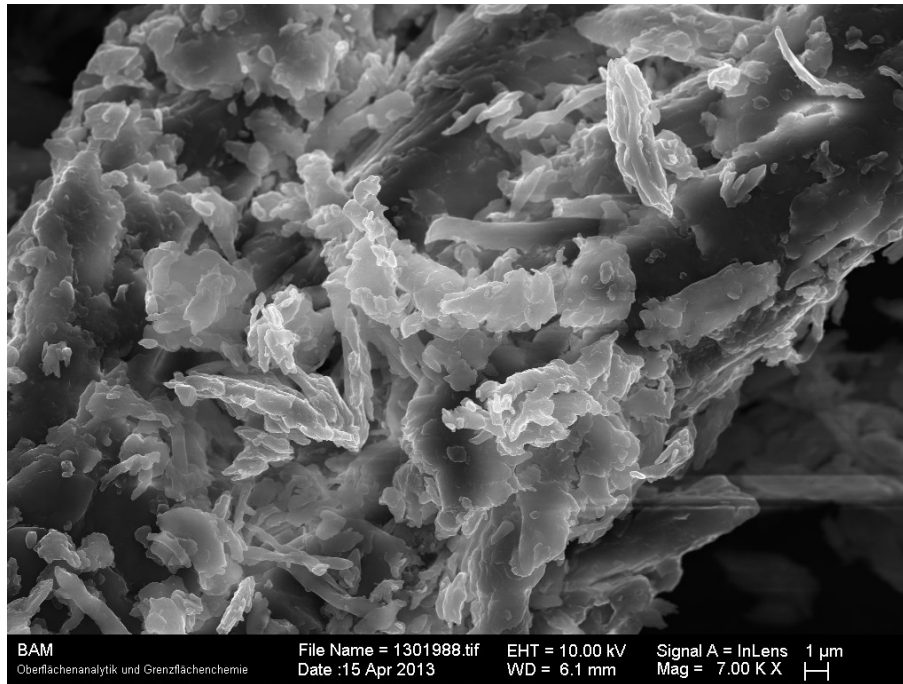


Abbildung 68: REM-Aufnahme der Haarprobe 2 (Trockenmahlung nach Versprödung mit flüssigem Stickstoff); 7000-fache Vergrößerung

Die trockene Mahlung nach Versprödung mittels flüssigem Stickstoff (zwei Minuten, Abbildung 68) führte im Vergleich zur vorhergehenden Abbildung auch zu kleineren Bruchstücken, welche scharfkantigere Strukturen aufweisen. Jedoch scheinen diese kleinen Bruchstücke weitaus größeren anzuhaften. Eine vorherige Versprödung muss offenbar nicht zu ausschließlich kleineren Fragmenten führen. Durch die extreme Kälte ist es auch möglich, dass von außen atmosphärischer Wasserdampf in den Mahlbecher eindrang und dort zur Befeuchtung der Probe führte. Ähnliche Effekte wie im nachfolgenden Beispiel wären bei diesem Szenario wahrscheinlich.

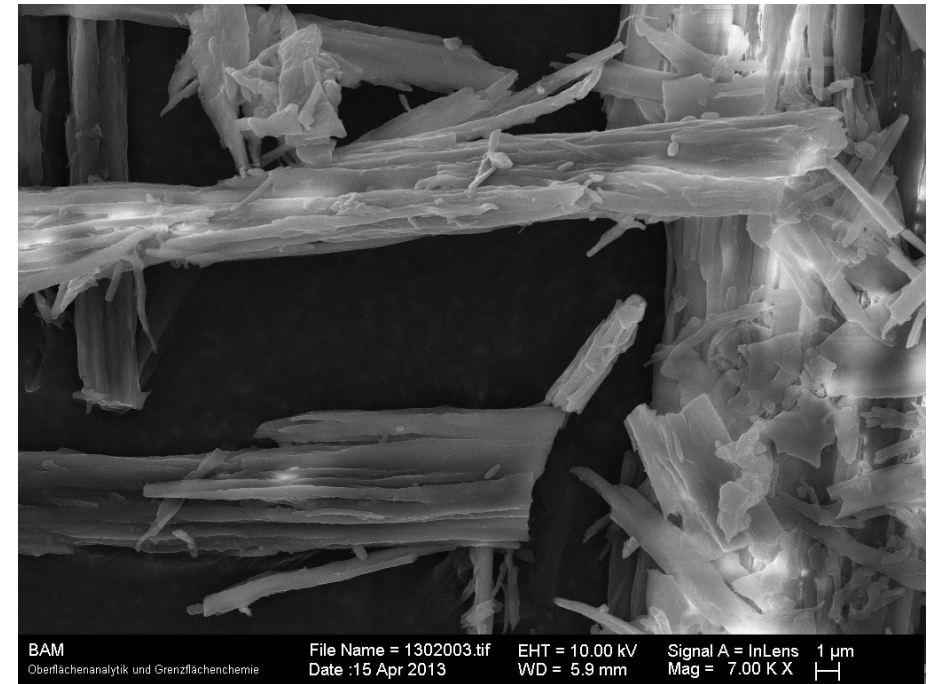


Abbildung 69: REM-Aufnahme der Haarprobe 3 (Nassmahlung Kap. 3.2.1); 7000-fache Vergrößerung

Die Aufnahme von Haarprobe 3 (Abbildung 69), die durch Mikropulverisierung (Kap. 3.2.1) mit anschließender Lyophilisierung hergestellt wurde, zeigt im Vergleich zu den trockenen Mahlvorgängen vergleichsweise große Strukturen. Es entstehen auch kleinere Fragmente, der Hauptanteil scheint jedoch aus grob zerquetschtem und aufgespaltenem Haar zu bestehen und weniger aus kleinen pulverartigen Fragmenten.



Abbildung 70: REM-Aufnahme der Haarprobe 3 (Nassmahlung Kap. 3.2.1); 1000-fache Vergrößerung

In Abbildung 70 ist eindeutig zu erkennen, dass es sich eher um intakte Haare handelt (Schnittlänge vor Behandlung ca. 1-2 mm), welche durch Einwirkung von Wasser und Mahlung im Eppendorfgefäß zerquetscht und in die Fibrillen (siehe Abbildung 3) aufgebrochen wurden. Eine Pulverisierung wie bei den vorangegangenen Versuchen fand nur in untergeordneter Rolle statt. Auf den ersten Blick klingt die Annahme kontrovers, dass die kurze Nassmahlung mit 30 Minuten Extraktionszeit vergleichbare Ergebnisse mit trockener Pulverisierung und anschließender Extraktion für 48 Stunden liefert [83], man kann sich den Vorgang allerdings folgendermaßen erklären:

Durch die Mahlung im Eppendorfgefäß, welches im Gegensatz zu den bei trockener Mahlung verwendeten Stahlgefäßen aus Kunststoff besteht, übertragen die Stahlkugeln bei sonst gleichen Bedingungen durch Dämpfung an den elastischen Gefäßwänden eine geringere Energie auf das Mahlgut als beim Aufprall an Gefäßwände aus Stahl oder aneinander. Diese Energie reicht zwar aus, um das in Wasser quellende Haar zu zerquetschen und die Struktur aufzubrechen, aber nicht, um es stark zu zerkleinern oder große Mengen der Makrofibrillen zu zerbrechen. Innenliegende Makrofibrillen werden im Zuge der Mikropulverisierung jedoch zugänglich gemacht. Durch die hohe Geschwindigkeit der Stahlkugeln in den Gefäßen und die dadurch hohe Durchmischung des Extraktionsmittels, wird für eine gute Konvektion im Innern des Eppendorf-Gefäßes gesorgt. Zusätzlich erfolgt beim Kontakt von Stahlkugel-Haar-Stahlkugel oder Stahlkugel-Haar-Gefäßwand eine sich fortlaufend wiederholende Quetschung der Haarmatrix. Man kann sich das Haar in diesem Falle wie einen Schwamm vorstellen: Da es in Wasser quillt, wird ein gewisser Anteil des Wassers, welcher sich im Haar befindet durch den Kontakt mit den Stahlkugeln ausgequetscht, um dann, nachdem die Kugel wieder weggeschleudert wird, in die Haarmatrix zurück zu strömen. Es wird so eine Mikrofluktuation von Lösemittel in die Haarmatrix und wieder hinaus erreicht. Diese Effekte führen zu einer hohen Extrahierbarkeit von EtG aus dem Haar in sehr kurzer Zeit.

#### A-4 Hielscher VialTweeter

Tabelle 42 und Tabelle 43 dienen als Ergänzung zu Kapitel 4.1.4. Sie zeigen die erhaltenen Ergebnisse und stellen tabellarisch einige statistische Kenngrößen zur Verfügung.

Tabelle 42: Statistische Daten zu Hielscher VialTweeter®

<i>Versuch</i>	<i>F</i>	<i>F<sub>KRIT</sub></i>	<i>p</i>	<i>Signifikanter Unterschied</i>
VT-1	436,2	4,7	$8,4 * 10^{-11}$	ja
VT-2	409,7	4,7	$1,2 * 10^{-10}$	ja
VT-3	341,1	4,7	$3,5 * 10^{-10}$	ja
VT-4	192,1	4,7	$9,6 * 10^{-9}$	ja
VT-5	188,4	4,7	$1,1 * 10^{-8}$	ja
VT-6	96,0	4,7	$4,5 * 10^{-7}$	ja
VT-7	43,5	4,7	$2,5 * 10^{-5}$	ja
VT-8	218,0	4,7	$4,7 * 10^{-9}$	ja
VT-9	95,0	4,7	$4,7 * 10^{-7}$	ja

Signifikante Unterschiede zum Referenzverfahren aus Kapitel 4.2.2

Tabelle 43: Detaillierte Einzelergebnisse zu den Extraktionsversuchen mittels Hielscher VialTweeter®

<i>Haarmaterial</i>	<i>Extraktionsmethode</i>	<i>Amplitude %</i>	<i>Pulsdauer %</i>	<i>Extraktionszeit min</i>	<i>n</i>	<i>Mittelwert pg/mg</i>	<i>SD pg/mg</i>	<i>RSD %</i>
Vorgewaschener Haarpool "HP-5-w"	Mikropulverisierung	-	-	30	9	24,6	1,9	7,7
	VialTweeter®	70	40	30	5	6,1	0,7	11,3
				60	5	10,4	1,7	16,9
				120	5	15,3	3,5	22,9
		100	20	30	5	7	0,4	5,5
				60	5	12,3	0,8	6,4
				120	5	9,4	1,8	18,7
		45	100	30	5	7,4	1,1	14,4
				60	5	13,9	2,1	14,8
				120	5	12,8	2,7	20,8

n: Anzahl der Wiederholversuche; SD: Standardabweichung; RSD: Relative Standardabweichung

## A-5 Massenspektren der untersuchten Glucuronide

Anhang 5 stellt erhaltene Massenspektren und Fragmentierungsmuster zu den in Kapitel 4.3.2 vorgestellten Glucuronsäure-Derivaten zur Verfügung und diskutiert die Entstehung der in Tabelle 31 aufgeführten Fragmente.

### 4-Acetaminophenyl- $\beta$ -D-glucuronid (Paracetamol-4-Glucuronid)

Paracetamol ist ein schmerzstillendes und fiebersenkendes Arzneimittel aus der Gruppe der Nichtopioid-Analgetika. Bei 4-Acetaminophenyl- $\beta$ -D-glucuronid handelt es sich um den Hauptmetaboliten. Die exakte Masse beträgt 327,10 und das korrespondierende Mutterion  $[M-H]^-$  im ESI<sup>-</sup> Modus trägt ein Massen- Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) von 326,0. Die Fragmente entstanden durch  $\alpha$ -Spaltung. Die Hauptfragmente konnten folgendermaßen beschrieben werden:

Durch Abspaltung von Acetat ( $m/z = 43$ ) entstand das Fragment mit  $m/z = 281$ . Wurde zusätzlich die gesamte Amid-Funktion von Paracetamol abgespalten, entstand das Fragment 57,0. Das Signal bei  $m/z = 149,8$  entstand durch Abspaltung der Glucuronsäure, wobei das Sauerstoffatom am Paracetamol-Bruchstück verblieb. Das Fragment 134 entstand bei Verbleib des Sauerstoffatoms am Glucuronid-Teil. Durch Deprotonierung der Glucuronsäure erhielt man das Signal bei  $m/z = 175$ . Siehe dazu auch Abbildung 32.

Die Massenfragmente 117, 113, 95, 85 und 75 entstanden durch Fragmentierung der Glucuronsäure und wurden anhand des Beispiels Ethylglucuronid besprochen.

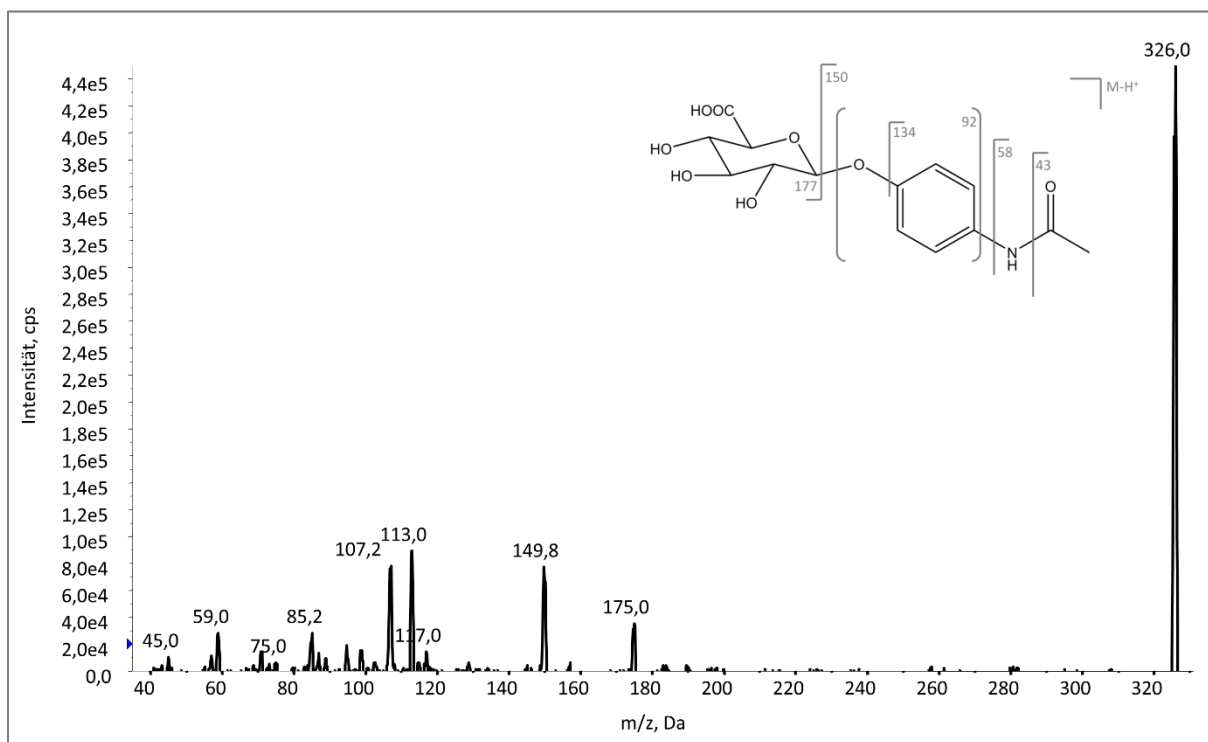


Abbildung 71: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von 4-Acetaminophenyl- $\beta$ -D-glucuronid; ESI<sup>-</sup>

### Acetylsalicylsäure-acyl- $\beta$ -D-glucuronid (Aspirin-acyl-Glucuronid)

Bei Acetylsalicylsäure (ASS) handelt es sich um ein frei verkäufliches Schmerzmittel aus der Gruppe der NSAIDs (nicht-steroidale Antirheumatika). Es wird gewonnen durch Acetylierung der Salicylsäure, die natürlich in verschiedenen Weidenarten, z.B. der Silberweide (*Salix alba*) vorkommt. Bei Acetylsalicylsäure-acyl- $\beta$ -D-glucuronid handelt es sich wiederum um einen Phase-II-Metaboliten der ASS, welcher mit Glucuronsäure konjugiert wird (Abbildung 72).

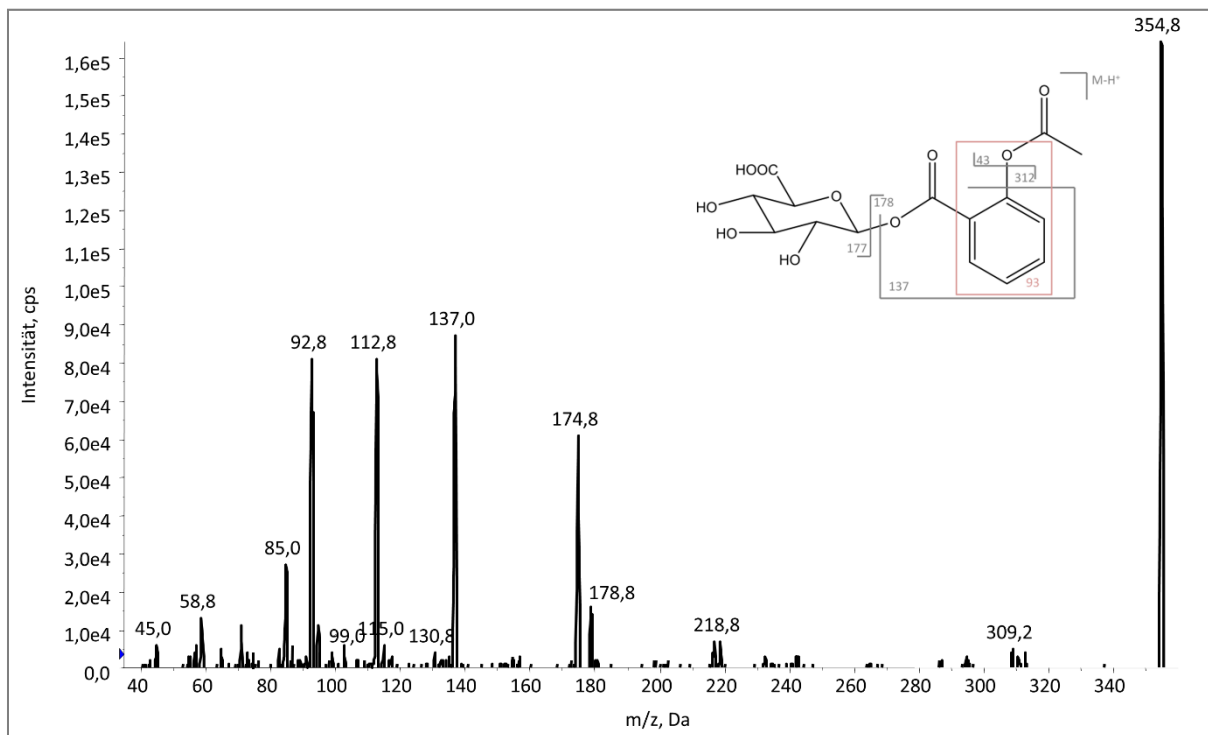


Abbildung 72: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von ASS-acetyl- $\beta$ -D-glucuronid, ESI<sup>-</sup>

Durch Abspaltung der Glucuronsäure entstanden die Fragmente  $m/z = 175$  (Glucuronsäure) und  $m/z = 178$  (Acetylsalicylsäure). Alleinige Abspaltung der Acetylgruppe lieferte das Ion bei  $m/z = 312$ . Das Signal bei  $m/z = 93$  entstand durch Fragmentierung am Phenolat. Das Fragment mit der formalen Struktur von Benzoesäure besaß die Masse  $m/z = 137$ .

#### Kaffeesäure-3- $\beta$ -D-glucuronid und Kaffeesäure-4- $\beta$ -D-glucuronid

Bei diesen beiden Glucuronsäurederivaten handelte es sich um Stellungsisomere. Die Massenspektren der beiden Substanzen unterschieden sich höchstens in der Intensität der einzelnen Signale.

Durch Abspaltung von  $\text{CO}_2$  entstand das Fragment mit  $m/z = 312$ , welches negativ ionisiert in einem Signal bei  $m/z = 310,6$  resultiert. Durch Abspaltung von Wasser bildete sich das Fragment mit der Masse 336,8. Die Fragmente mit  $m/z = 175$  und 180 entstanden durch Abspaltung von Glucuronsäure von den Kaffeesäuremolekülen, wobei das Sauerstoffatom am Kaffeesäureteil verblieb (Abbildung 73 & Abbildung 74). Auch hier entstanden die Massenfragmente 117, 113, 95, 85 und 75 durch Fragmentierung des Glucuronid-Teils wie üblich nach negativer Ionisierung (siehe EtG).

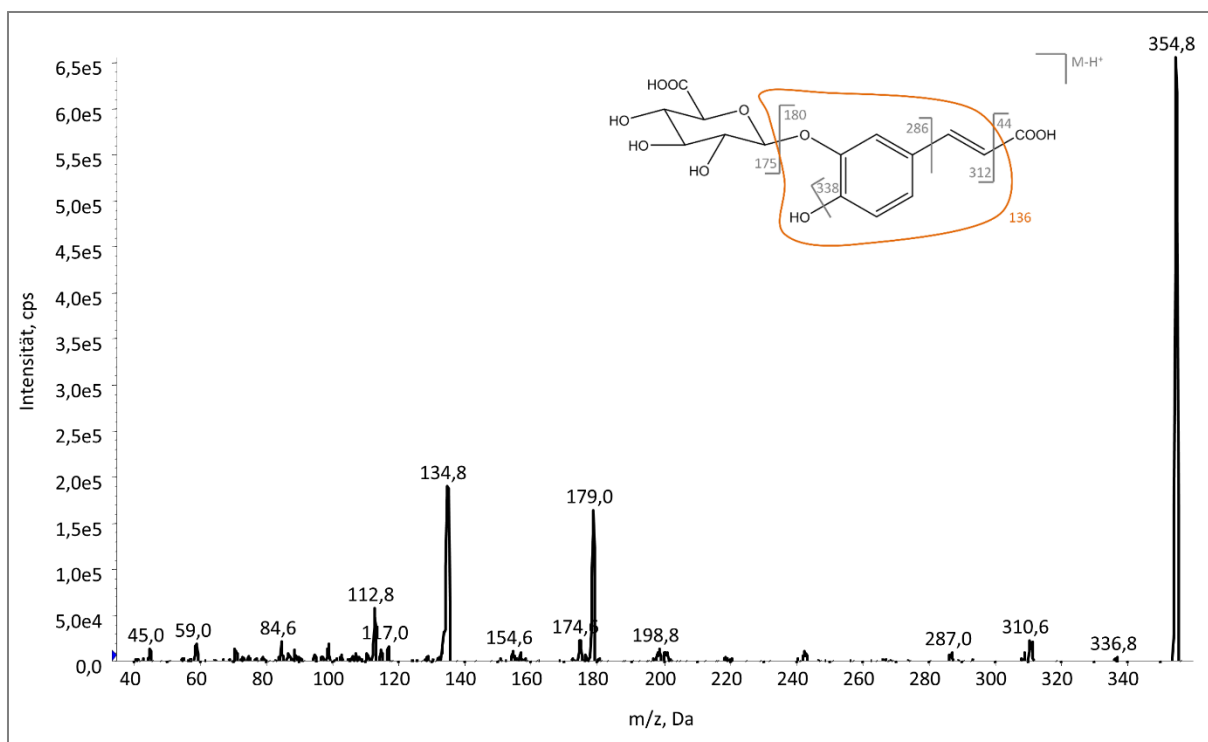


Abbildung 73: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Kaffeesäure-3-β-D-glucuronid; ESI<sup>-</sup>

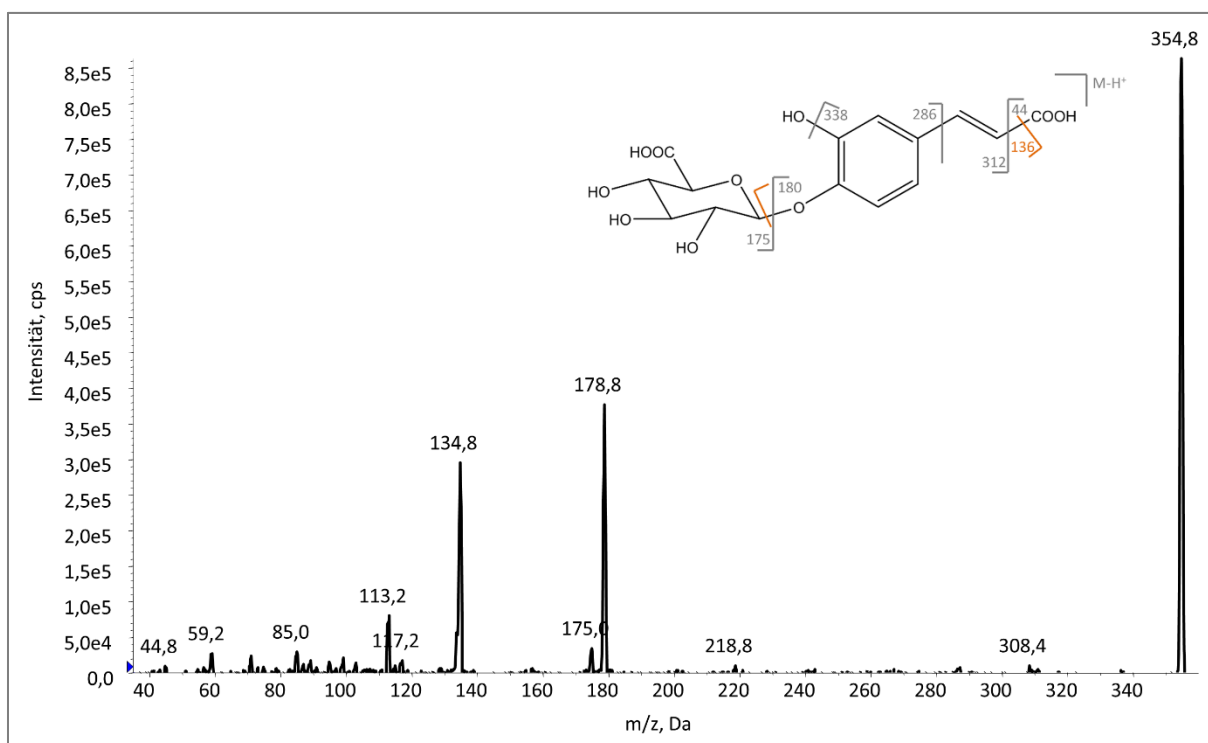


Abbildung 74: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Kaffeesäure-4-β-D-glucuronid; ESI<sup>-</sup>

## Carvedilol-β-D-glucuronid

Bei Carvedilol-β-D-glucuronid handelt es sich um einen Metaboliten von Carvedilol, einem Betablocker zur Behandlung des Bluthochdrucks, der Angina pectoris und der Herzinsuffizienz ([www.roche.de](http://www.roche.de)). Die exakte Masse lautet  $582.22 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Das Fragmentierungsmuster ist in Abbildung 75 dargestellt.

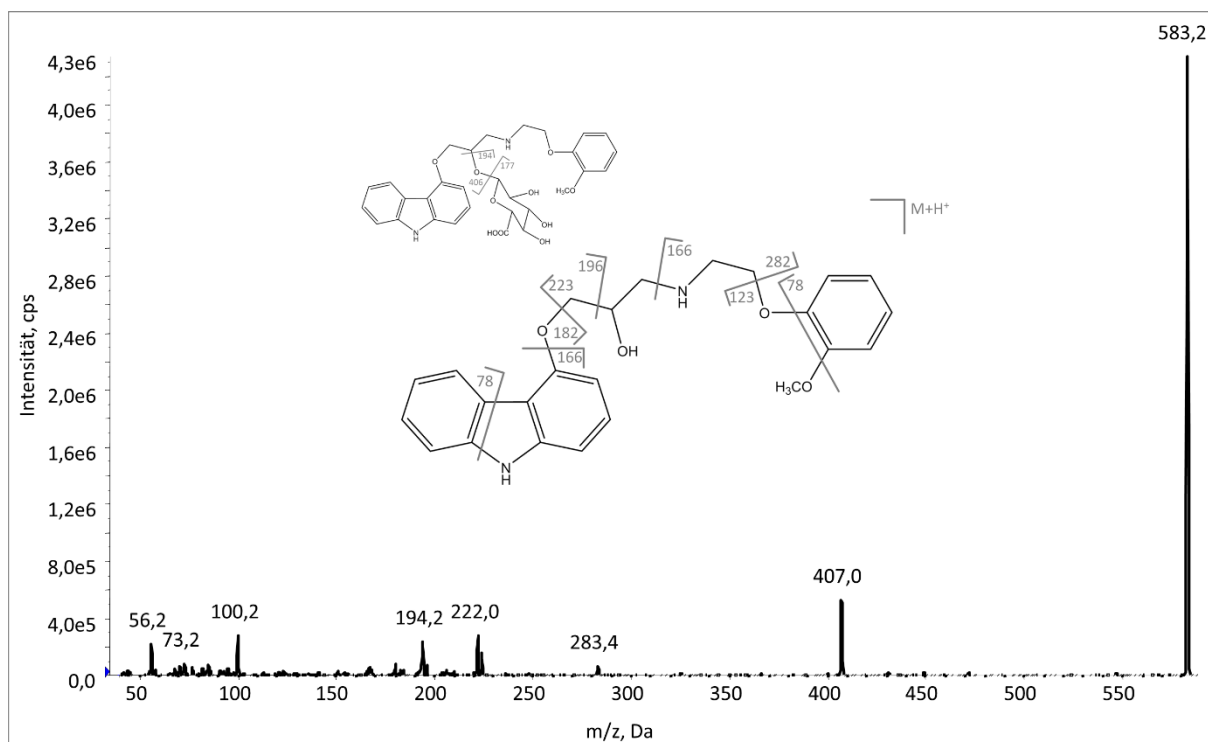


Abbildung 75: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Carvedilol-β-D-glucuronid

Da die Ionisierung im positiven Modus mit ESI etwa um den Faktor 10 besser abläuft als im negativen Modus, wurde nur die Optimierung im positiven Modus durchgeführt. Durch Aufnahme eines Protons liegt die Masse des Mutterions bei  $[M+H]^+ = 583.068$ . Zur leichteren Zuordnung der Fragmente zeigt Abbildung 76 eine Nummerierung der C-Atome der funktionellen Einheiten von Carvedilol-β-D-glucuronid.

Das Hautfragment im Massenspektrum mit dem Massen-Ladungsverhältnis von 407,0 entsteht durch Abspaltung der Glucuronsäure, wobei der Sauerstoff am Carvedilol-Fragment verbleibt. Wird dieser ebenfalls abgespalten, erhält man ein Glucuronsäure-Fragment mit der Masse 194. Nach Abspaltung der Glucuronsäure liegt also weitgehend natives Carvedilol vor, welches folgendermaßen fragmentiert (Tabelle 44).

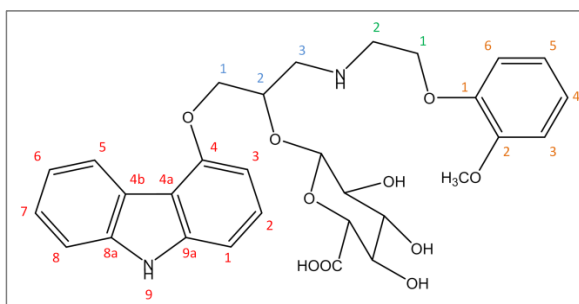


Abbildung 76: Nummerierung der C-Atome der funktionellen Einheiten des Carvedilol-β-D-Glucuronids



Tabelle 44: Fragmentierung des Carvedilol-β-D-glucuronids

<i>Fragment</i>	<i>Spaltung</i>
123 / 282	Masse von 2-Methoxyphenol (orange) / Rest Carvedilol
166	Spaltung zwischen C-3 des 1,2-Propandiols und Stickstoff des Ethanolamins oder Abspaltung Carbazol
196	Spaltung zwischen C-1 und C-2 des 1,2-Propandiols
223 / 182	Abspaltung des Sauerstoffes an C-1 des 1,2-Propandiol

**Clopidogrel acyl-β-D-glucuronid**

Bei Clopidogrel handelt es sich um einen kommerziell eingesetzten Thrombozytenaggregationshemmer, welcher insbesondere zur Vorbeugung von akutem Koronarsyndrom und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit eingesetzt wird ([www.sanofi.de](http://www.sanofi.de)).

Das Fragmentierungsmuster wurde wegen der Vielzahl an erhaltenen Fragmenten tabellarisch (Tabelle 45) dargestellt. Das Zerfallsmuster anhand eines Massenspektrums ist in Abbildung 77 abgebildet.

Tabelle 45: Fragmentierungsmuster von Clopidogrel-acyl-β-D-glucuronid

<i>m/z</i>	<i>Erklärung</i>
483,98	[M+H] <sup>+</sup>
465,8	[M+H] <sup>+</sup> - H <sub>2</sub> O
374 / 111	Spaltung innerhalb des hydrierten Pyridinsystems
355	374 - H <sub>2</sub> O
338	356 - H <sub>2</sub> O
308	Clopidogrel ohne Glucuronsäure
167	Chlorphenylelessigsäure
152	N-Methyl-dihydropyridin-thiophen
141	Dihydropyridin-thiophen
125	Chlortropylium
111	Chlorphenyl

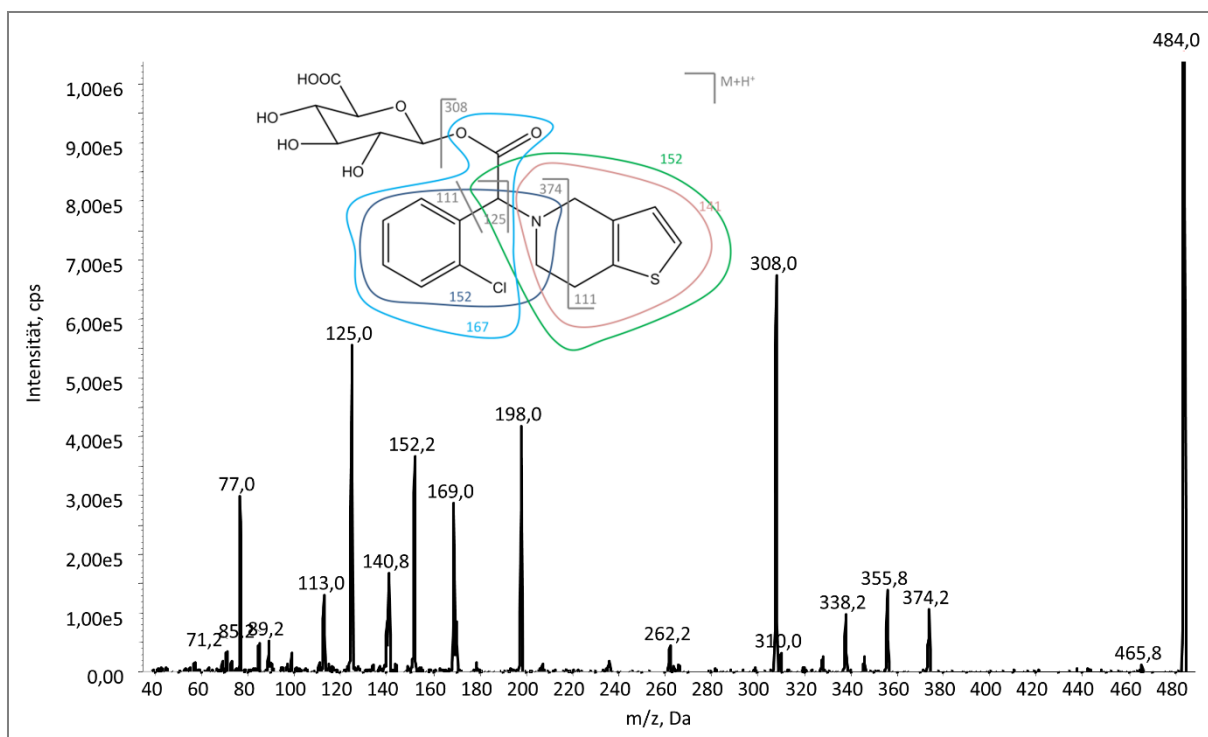


Abbildung 77: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Clopidogrel-acyl- $\beta$ -D-glucuronid, ESI<sup>+</sup>

### Cotinin-N- $\beta$ -D-glucuronid

Cotinin ist ein Metabolit des Nikotins. Er eignet sich zum Monitoring des Rauchverhaltens in Plasma, Urin und Haaren [132, 135]. Das N- $\beta$ -D-glucuronid ist ein Phase-II-Metabolit des Cotinins.

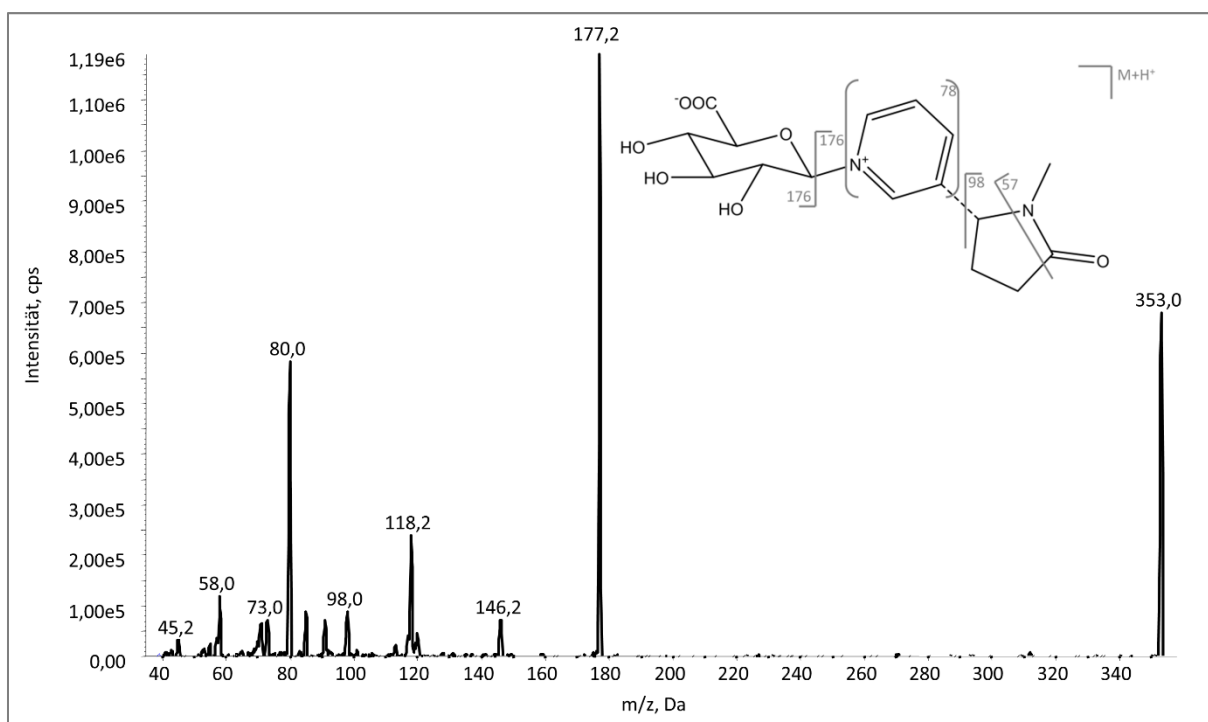


Abbildung 78: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Cotinin-N- $\beta$ -D-glucuronid, ESI<sup>+</sup>

Unter positiver ESI-Ionisierung bildete es ein Mutterion mit der Masse  $[M+H]^+ = 352.953$  g/mol. Durch Abspaltung der Glucuronsäure entstanden zwei Fragmente mit der Masse 176. Positiv ionisiert wiederum resultierten diese dann in dem prominenten Signal bei  $m/z = 177,2$ . Der protonierte Pyridinring lieferte das Fragment bei  $m/z = 78$  und durch Abspaltung des 1-Methyl-2-Pyrrolidinon-Anteils entstand das Signal bei  $m/z = 98$ . Siehe auch Abbildung 78.

### Propofol- $\beta$ -D-glucuronid

Propofol dient als Injektionsnarkotikum und wird zur Sedierung, Einleitung und z. T. auch Aufrechterhaltung einer Narkose verwendet. Dabei hat es jedoch keine schmerzlindernde Wirkung ([www.astrazeneca.com](http://www.astrazeneca.com)). Das Glucuronid ist ein Phase-II-Metabolit des Propofols mit der molaren Masse von 354,40 g/mol. Als einzige der hier vorgestellten Substanzen liegen bereits Beschreibungen zum Nachweis im Haar [141, 142] vor. Dadurch wurde Propofol zu einem potentiellen Kreuzreaktanden, da hier schon bewiesen wurde, dass sein Glucuronid in Haar eingelagert wird. Durch negative Ionisierung im ESI<sup>-</sup> Modus entstand das Mutterion mit  $[M-H]^- = 352,953$ . Nach Abspaltung des 2,6-Diisopropylphenols von der Glucuronsäure entstanden zwei gleich schwere Fragmente, die bei  $m/z = 177$  detektiert werden konnten. Auch hier ließen sich weitere Massen (175, 113, 85, 75, 59) durch Spaltung der Glucuronsäure erklären (Abbildung 79).

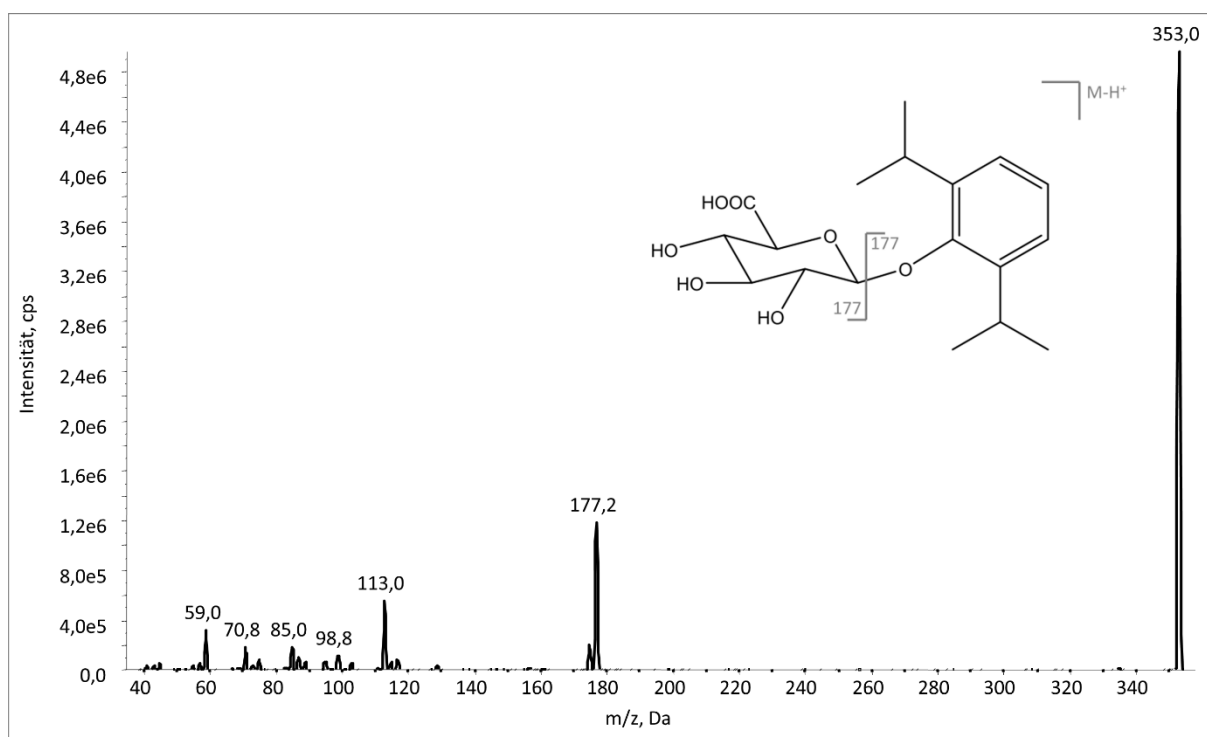


Abbildung 79: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Propofol- $\beta$ -D-glucuronid, ESI<sup>-</sup>

### Quercetin- $\beta$ -D-glucuronid

Quercetin ist ein gelber Farbstoff aus der Gruppe der Flavonoide. Er kommt im Pflanzenbereich ubiquitär vor [144]. Besonders hohe Gehalte lassen sich in Kapern und Liebstöckel finden. Das Fragmentierungsmuster ist in Abbildung 80, die Fragmentzuordnung in Tabelle 46 dargestellt.

Tabelle 46: Fragmentierungsmuster von Quercetin- $\beta$ -D-glucuronid

$m/z$	Erklärung
476,96	$[M-H]^+$ Quercetin- $\beta$ -D-glucuronid
301 / 177	Quercetin / Glucuronsäure
192	Abspaltung 1,2-Dihydroxybenzol und Glucuronsäure
151	Abspaltung Glucuronsäure und 1,2-Dihydroxyphenyl-ethanol
109	1,2-Dihydroxybenzol

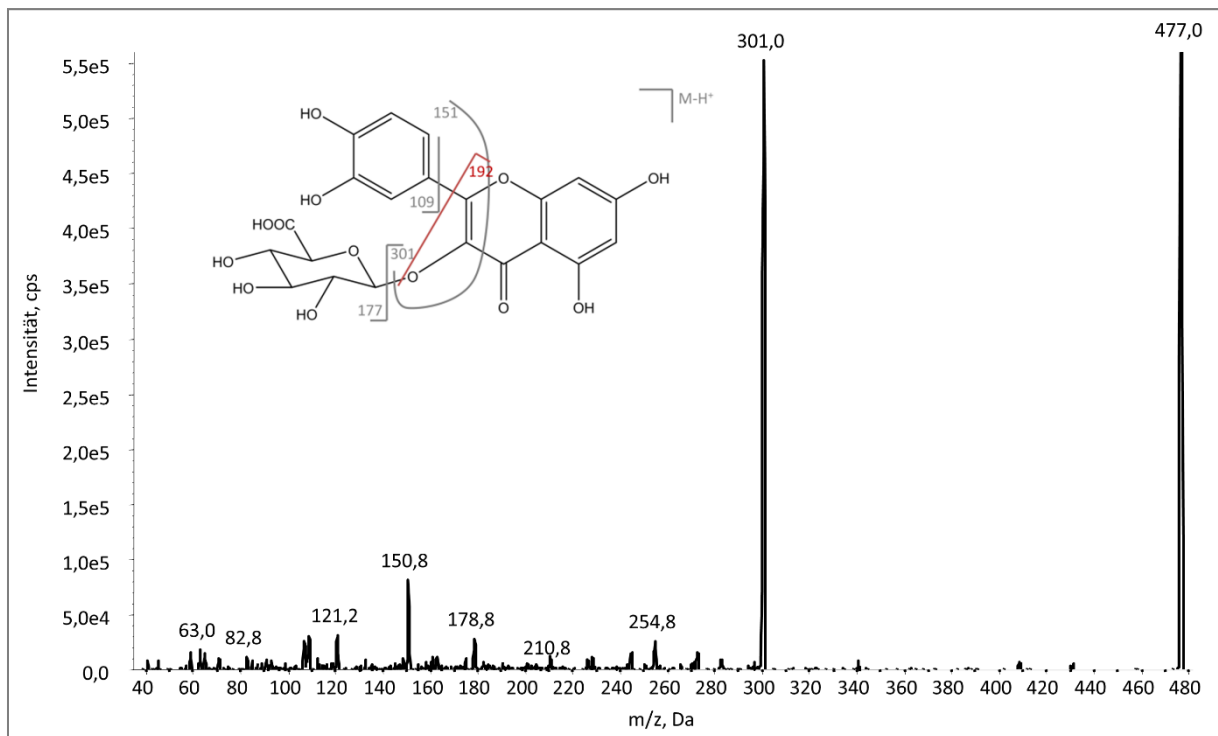


Abbildung 80: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Quercetin- $\beta$ -D-glucuronid, ESI<sup>+</sup>

### Serotonin- $\beta$ -D-glucuronid

Serotonin ist ein Neurotransmitter im menschlichen Körper. Er ist aber auch fast im gesamten Tierreich sowie in Pflanzen und Pilzen anzutreffen [50]. Beim Glucuronid handelt es sich um einen Phase-II-Metaboliten des Serotonins.

In Abbildung 81 ist das Fragmentierungsmuster und Massenspektrum von Serotonin- $\beta$ -D-glucuronid abgebildet.

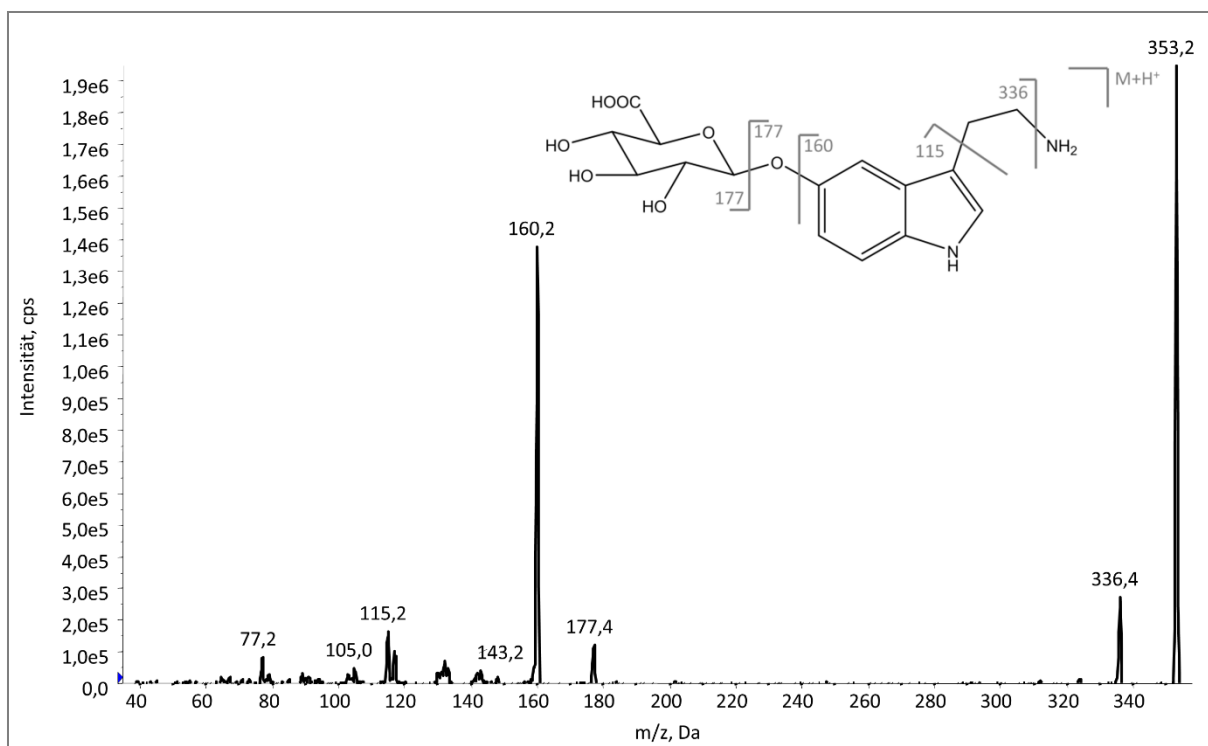


Abbildung 81: Massenspektrum und Fragmentierungsmuster von Serotonin-β-D-glucuronid, ESI<sup>+</sup>

Tabelle 47 zeigt die Fragmentzuordnung zu den im Massenspektrum erhaltenen Massen.

Tabelle 47: Fragmentierungsmuster von Serotonin-β-D-glucuronid

<i>m/z</i>	<i>Erklärung</i>
353,2	[M+H] <sup>+</sup>
336,4	[M+H] <sup>+</sup> - NH <sub>3</sub>
177	Glucuronsäure / Serotonin
160	Serotonin ohne den verbindenden Sauerstoff
115	Indol-Grundkörper

A-6 Ergänzung zu den SoHT-Ringversuchen EtG in Haaren

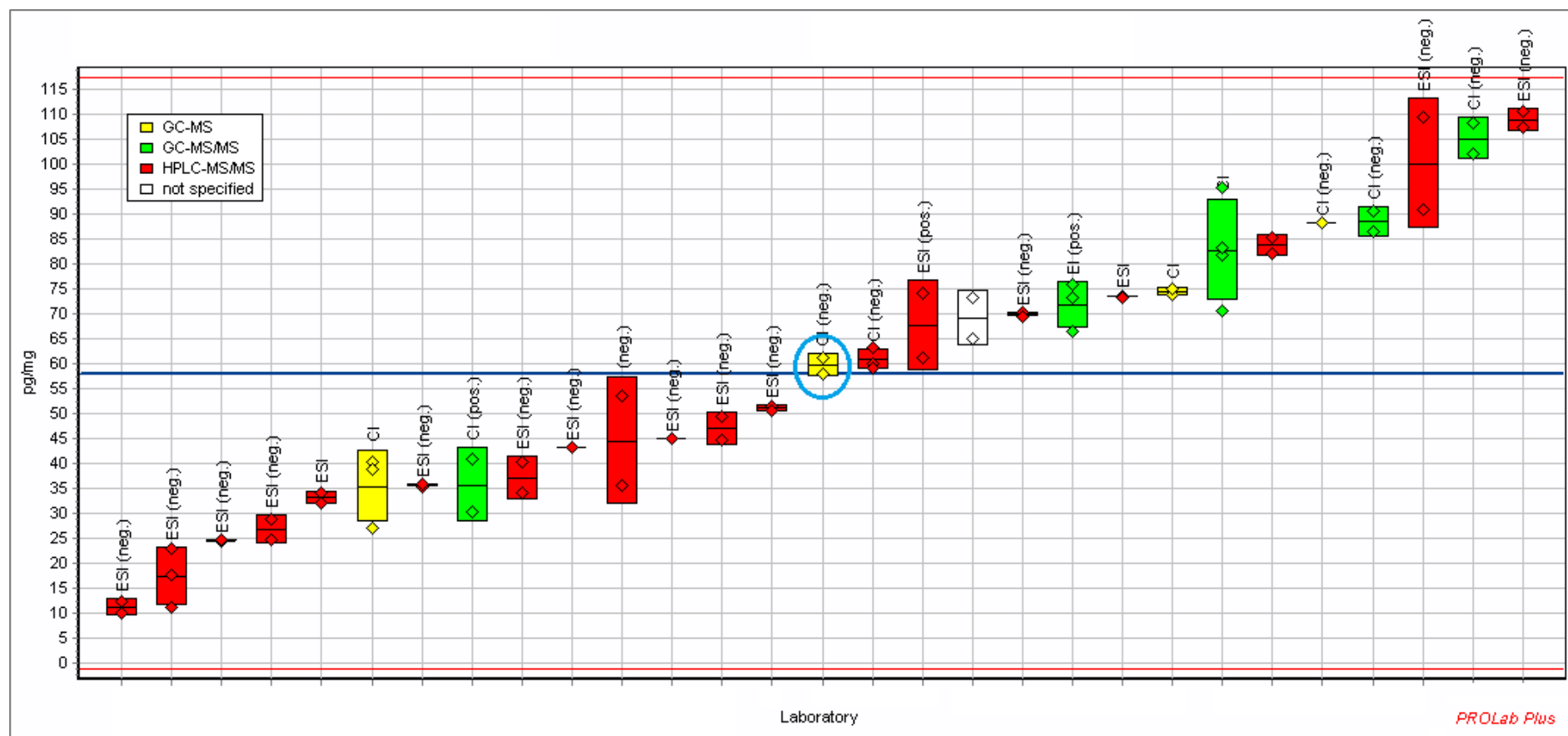


Abbildung 21 zwecks besserer Lesbarkeit in größerem Format

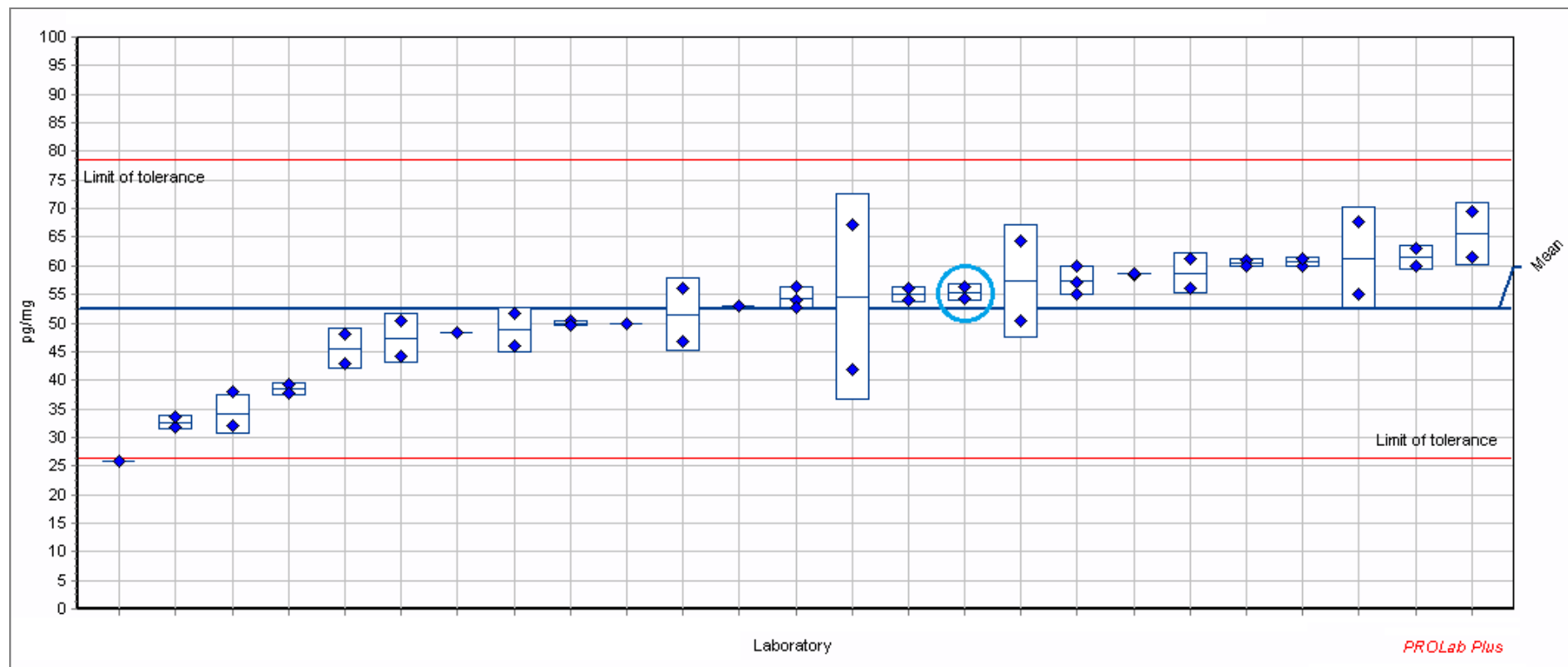
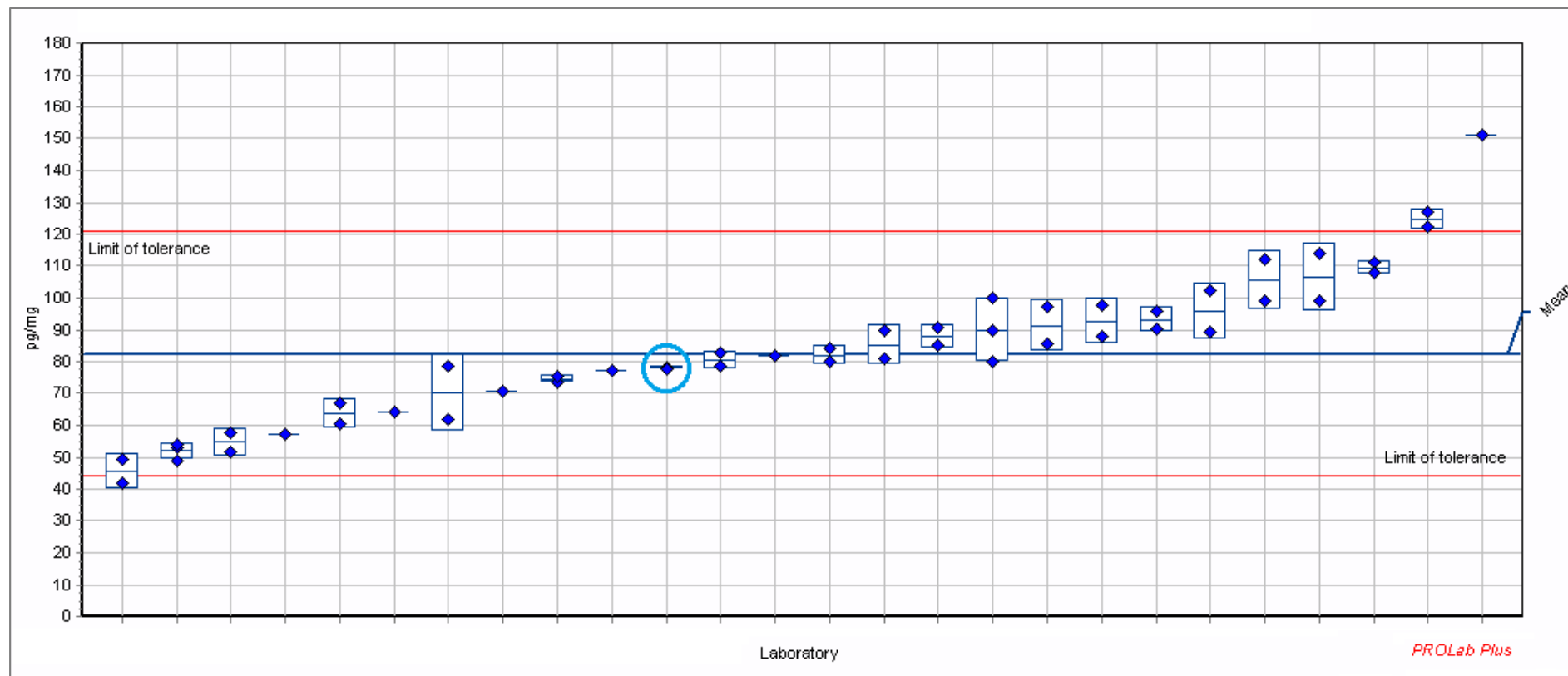


Abbildung 24 zwecks besserer Lesbarkeit in größerem Format





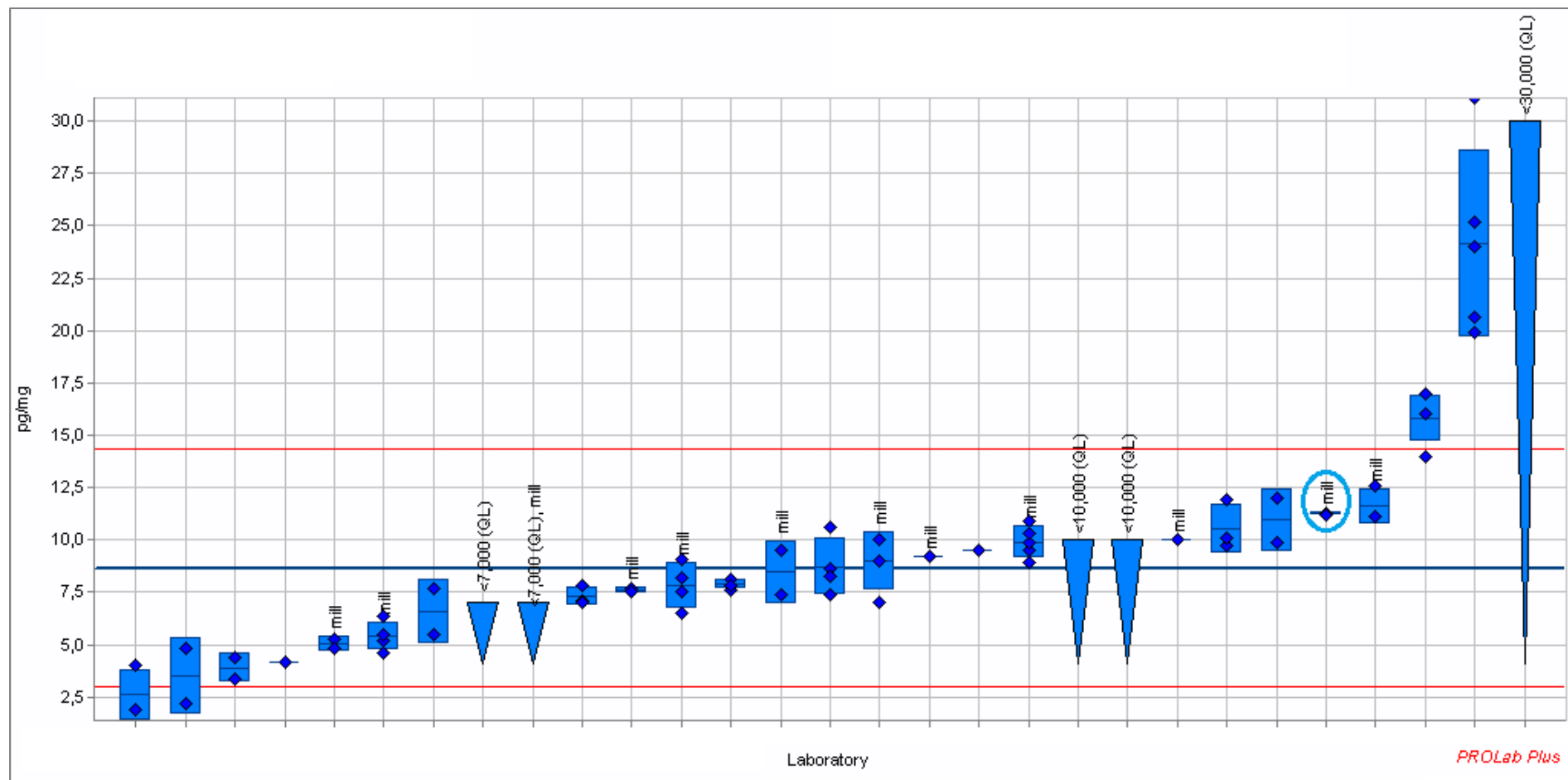


Abbildung 26 zwecks besserer Lesbarkeit in größerem Format